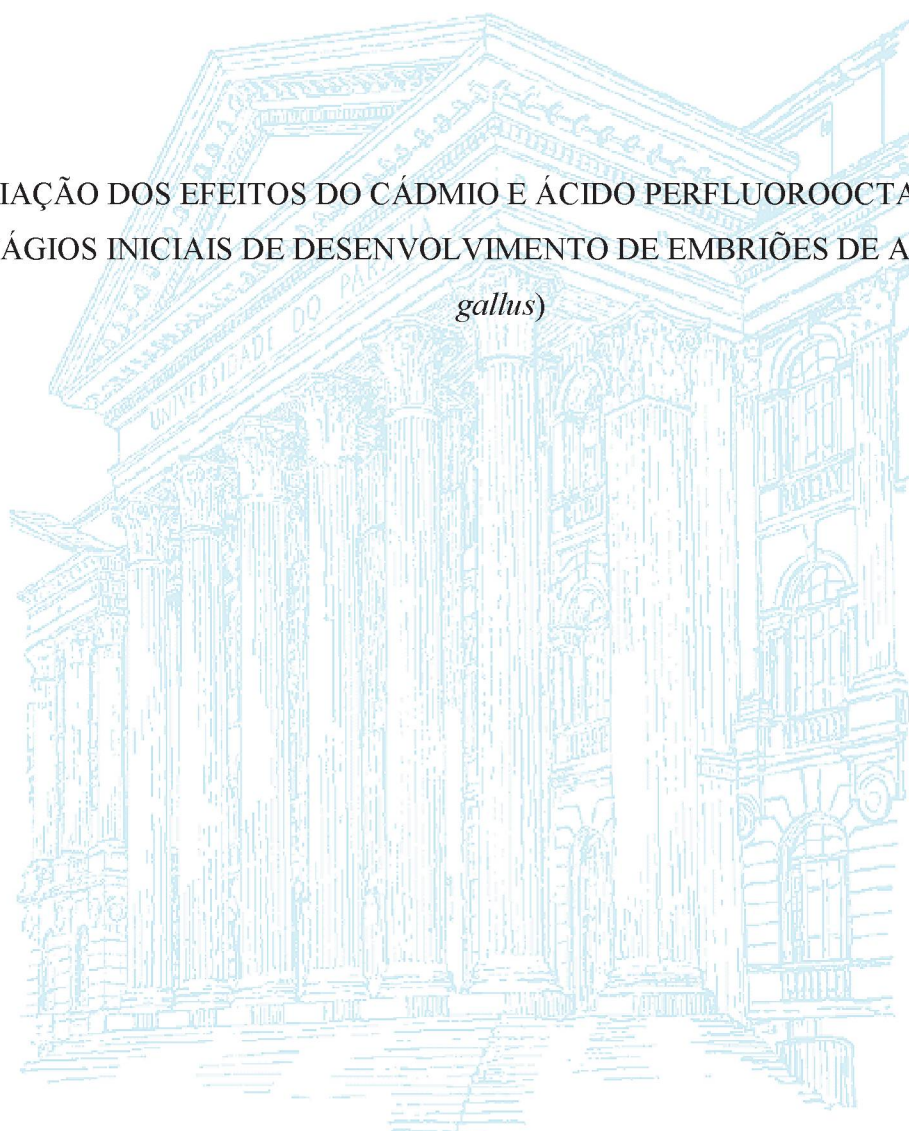


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELYSSA KMECICK

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CÁDMIO E ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO NOS
ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE AVE (*Gallus
gallus*)



CURITIBA

2017

MELYSSA KMECICK

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CÁDMIO E ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO NOS
ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE AVE (*Gallus
gallus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Feijó Ortolani-Machado
Coorientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Kmecick, Melyssa

Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos
estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*). /
Melyssa Kmecick. – Curitiba, 2017.

78 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Claudia Feijó Ortolani-Machado

Coorientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Poluentes. 2. Morfologia. 3. Ave. I. Título II. Ortolani-Machado,
Claudia Feijó. III. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira. IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Profa. Dra. Claudia Feijó Ortolani-Machado

Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho
Grade
UNILA

Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná

Suplente:

Profa. Dra. Maria Cristina Leme G. dos Santos
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestrandia **Melyssa Kmecick**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*)", são de parecer favorável à ~~aprovação~~ ^{aprovação} da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Março de 2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Claudia Feijó Ortolani-Machado, pela paciência, conselhos e incentivo desde a iniciação científica.

Ao meu coorientador, professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por toda ajuda desde o início desse trabalho.

Aos professores que ao longo dos dois anos de mestrado avaliaram os relatórios e contribuíram com o enriquecimento do projeto.

À professora Patricia Franchi de Freitas, pelo auxílio com a coloração dos embriões e análise das lâminas.

À professora Djanira Aparecida da Luz Veronez, pela paciência e ajuda com a análise morfométrica.

Aos meus pais, Jorge e Roselaine, por todo amor e apoio desde o início da minha vida acadêmica.

Ao André, por todo amor, apoio, companheirismo, paciência e por acreditar em mim.

Às minhas amigas companheiras de graduação e pós-graduação, Ludiana e Marcelle, que se aventuraram comigo nesses dois anos de mestrado, tornando os dias e noites de estudo mais fáceis desde a preparação para o processo seletivo do mestrado.

Às minhas colegas do Laboratório de Embriotoxicologia, pelo convívio e toda ajuda proporcionada.

Aos demais professores e colegas do Laboratório de Toxicologia Celular.

À Seara (JBS), pelo fornecimento dos ovos.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao Conselho Nacional Científico Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

A Deus, por estar sempre presente na minha vida.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

RESUMO

No ambiente os organismos vivos estão expostos há vários tipos de poluentes que podem interagir, potencializando ou inibindo os efeitos tóxicos. O cádmio (Cd) e o ácido perfluorooctanóico (PFOA) são poluentes presentes no ambiente, persistentes, bioacumuláveis e capazes de vencer a barreira placentária. Estudos revelam alterações no desenvolvimento como consequência da exposição pré-natal a esses contaminantes, porém faltam evidências dos efeitos em períodos mais iniciais do desenvolvimento, que permitam um grau de extrapolação entre as espécies. O embrião de ave apresenta semelhanças morfológicas com outros vertebrados, inclusive humanos, em determinados estádios de desenvolvimento (que incluem o 3º dia de incubação), além de ser de fácil obtenção e manipulação. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da exposição ao Cd, PFOA e à mistura de ambos, em embriões de ave (*Gallus gallus*), após 72 horas de incubação. A exposição foi realizada injetando-se solução do contaminante ou veículo, diretamente na câmara de ar, previamente a incubação por 72h, a 38°C. As concentrações utilizadas foram 0,5, 5 e 25 µg/ml de Cd e 5, 50 e 250 ng/ml de PFOA. Na mistura foram empregadas as menores concentrações. Foi também utilizado um controle do ambiente com ovos não injetados. Os ovos foram abertos, a frequência cardíaca foi aferida nos embriões vivos e a mortalidade foi determinada. Os embriões vivos foram coletados e preparados para as demais análises através da técnica de montagem total. A morfologia foi analisada seguindo os critérios descritos por Hamburger e Hamilton (1951) e para a análise morfométrica foram mensurados parâmetros corporais e encefálicos. A biodisponibilidade e o acúmulo de Cd foram analisados empregando-se o marcador fluorescente Leadmium Green. A exposição ao Cd na maior concentração aumentou significativamente a mortalidade e ocorrência de malformações. As três concentrações de PFOA e a mistura elevaram significativamente a taxa de malformações, porém não alteraram a mortalidade. Foram observadas alterações na curvatura do corpo, região encefálica, do tronco e caudal, falha no fechamento do tubo neural na região entre os brotos das asas e das pernas e defeito na parede do corpo. O Cd e o PFOA não alteraram significativamente a frequência cardíaca, bem como os parâmetros morfométricos analisados. As alterações morfológicas encontradas nesse trabalho podem ser futuramente relacionadas ao aparecimento de diferentes tipos de defeitos congênitos já relatados em humanos, como defeitos do tubo neural, síndrome da regressão caudal, defeitos na parede do corpo, lordose, escoliose e outras malformações da coluna vertebral. Muitas das alterações observadas são incompatíveis com a continuidade do processo de desenvolvimento devido à presença de intensas malformações e ausência de estruturas importantes. Além disso, as malformações estão associadas a outras complicações clínicas como déficits intelectuais, distúrbios neurológicos, geniturinários, gastrointestinais e cardíacos. Dessa forma, conclui-se que o estudo dos efeitos do Cd e PFOA em embriões de galinha revela preocupação quanto à exposição pré-natal humana, uma vez que são substâncias persistentes e presentes no ambiente.

Palavras-chave: PFOA; Cd; poluentes persistentes; embriotoxicologia; morfologia; morfometria.

ABSTRACT

Living organisms are exposed to several pollutants that can interact with each other either potentiating or inhibiting the toxic effects. Cadmium (Cd) and perfluorooctanoic acid (PFOA) are pollutants ubiquitous in the environment, persistent, bioaccumulative and able to cross the placental barrier. Studies reveal effects on development as a consequence of prenatal exposure to these contaminants, but there is a lack of studies at earlier stages of development that allow cross-species translational implications. The avian embryo presents morphological similarities with other vertebrates, including humans, at certain stages of development (which include the 3rd day of incubation), besides being easy to obtain and manipulate. The aim of this work was to evaluate the effect of exposure to Cd, PFOA and the mixture of both, in chick embryos (*Gallus gallus*) after 72 hours of incubation. The exposure was performed by injecting solution of the contaminant or vehicle, directly into the air chamber, prior to incubation for 72h at 38° C. The concentrations used were 0.5, 5 and 25 µg/ml of Cd, and 5, 50 and 250 ng/ml of PFOA. The lowest concentrations were used for the mixture. Non-injected group of eggs were also used as a control. The eggs were opened, heart rate was measured in living embryos and mortality was determined. The live embryos were collected and prepared for other analyzes using the whole mount technique. The morphology was analyzed according to the criteria described by Hamburger and Hamilton (1951) and for the morphometric analysis body and brain parameters were measures. The bioavailability of Cd was analyzed using the fluorescent dye Leadmium Green. Exposure to Cd at the highest concentration increased mortality and occurrence of malformations. The three concentrations of PFOA and the mixture increased the rate of malformations, but did not increase the mortality. Alterations observed include: distorted curvature of the body modifications at encephalic, trunk and caudal regions, failure of neural tube closure between the limb buds and ventral wall body defect. Cd and PFOA exposure did not significantly change the heart rate as well as the morphometric parameters. The morphological alterations found in this study may be related to the appearance of different types of congenital defects previously reported in humans, such as neural tube defects, caudal regression syndrome, ventral wall body defects, lordosis, scoliosis and other spinal malformations. Many of the malformations observed are incompatible with the continuity of development due to their severity. In addition, previous studies have already associated malformations with other clinical complications such as intellectual deficits, neurological, genitourinary, gastrointestinal and cardiac disorders. Thus, we conclude that studying Cd and PFOA effects in chick embryos can indicate and infer concerns about human prenatal exposure, since they are persistent and ubiquitous substances in the environment.

Keywords: PFOA; Cd; Persistent pollutants; Embryotoxicology; Morphology; Morphometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 CÁDMIO	7
1.2 POLUENTES EMERGENTES	9
1.3 COMPOSTOS PERFLUORADOS	10
1.4 ÁCIDO PERFLUOOCTANÓICO (PFOA).....	11
1.5 MISTURAS DE POLUENTES	13
1.6 EMBRIOTOXICOLOGIA	13
1.7 EMBRIÃO DE AVE <i>Gallus gallus</i> COMO MODELO PARA A EMBRIOTOXICOLOGIA	14
1.8 JUSTIFICATIVA	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 MODELO BIOLÓGICO	18
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	19
3.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO.....	20
3.4 ABERTURA DOS OVOS	22
3.5 ANÁLISE DA MORTALIDADE	23
3.6 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	24
3.7 BIODISPONIBILIDADE DO CÁDMIO	24
3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA	25
3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	27
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
4.1 MORTALIDADE	30
4.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	31
4.3 BIODISPONIBILIDADE DO CÁDMIO	32
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA	33
4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	44
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos de produtos químicos sobre os ecossistemas naturais tendo como objetivo identificar e prever as consequências ambientais negativas causadas por essas substâncias. Estes estudos possibilitam demonstrar o risco de exposição e embasar medidas para controlar a liberação e minimizar os seus efeitos (TARAZONA; RAMOS-PERALONSO, 2014).

As atividades antrópicas produzem, em abundância, uma grande variedade de resíduos urbanos, industriais e agrícolas que são constantemente liberados no ambiente e acabam por contaminar e comprometer os ecossistemas terrestres e aquáticos. A partir do século XX, diversas classes de poluentes orgânicos e inorgânicos passaram a ser liberados de forma pouco controlada nos ambientes naturais e atualmente existem mais de 127 milhões de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas registradas (Chemical Abstract Service, 2017). A partir dos anos 50 pós-guerra, a sociedade passou a discutir mais os problemas ambientais e com isso os riscos de exposição crônica destes contaminantes para os ecossistemas aquáticos e terrestres (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Neste período foi criada a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), que representou um marco na regulamentação tanto da emissão quanto no estabelecimento dos níveis máximos permissíveis da presença de xenobióticos para várias matrizes ambientais como o sedimento, água e biota.

1.1 CÁDMIO

O cádmio (Cd) é um metal de transição, pertencente ao grupo IIb da tabela periódica e é o 64º elemento mais abundante na natureza (ICdA, 2017a). É altamente tóxico, sendo classificado em 7º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da Agência Americana para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2015). O Cd está presente no ambiente em baixas concentrações, porém as atividades antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos e mineração (ATSDR, 2012) tem contribuído para a disseminação desse metal e seu aumento nos ambientes naturais (WHO, 2010). É utilizado na produção de baterias, pigmentos, plásticos (PVC), no processo de galvanização, além de estar presente no cigarro (WHO, 2010). Na população humana as principais vias de exposição são a oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados, e a

respiratória, por inalação do ar em áreas urbanas e próximas a indústrias (ANDUJAR; BENSEFA-COLAS; DESCATHA, 2010; SANTOS et al., 2013; RAHBAR et al., 2014). Além disso, a exposição ao Cd é elevada pela inalação da fumaça do cigarro, uma vez que as folhas do tabaco acumulam altos níveis desse metal (DA SILVA et al., 2016; ICdA, 2017b). Para cada cigarro fumado 0,2-1,0 µg de Cd pode ser absorvido (LEWIS et al., 1972; ZHANG et al., 2009). Recentemente foi mostrado que bijuterias e brinquedos também podem ser fontes de exposição ao Cd (GUNEY; ZAGURY, 2012). Após ser absorvido pelo organismo, é rapidamente transportado pelo sangue e se acumula principalmente no fígado, pulmão e rins (CHANG et al., 2012; TÊTE et al., 2014) e devido à sua baixa taxa de excreção e uma meia vida biológica de aproximadamente 14 anos em homens e 23 anos em mulheres (SUWAZONO et al., 2009), torna-se um potente elemento tóxico.

O Cd não é considerado um metal essencial, já que não existem funções fisiológicas conhecidas (SERAFIN et al., 2012), porém sabe-se que é capaz de interagir com outros elementos como o cobre, o ferro e o zinco (MATOVIC et al., 2015) e interferir em vários processos celulares como progressão do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose, replicação e reparo do DNA (BERTIN; AVERBERCK, 2006) e atividade de enzimas antioxidantes (JURCZUK et al., 2004). As vias de sinalização envolvidas nestes processos podem sofrer interferência do Cd devido a sua similaridade físico-química com íons cálcio (CHOONG; LIU; TEMPLETOM, 2014). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) (2012), esse metal é carcinogênico em humanos e animais, enquanto estudos epidemiológicos revelam a associação da exposição humana crônica com um maior risco de ocorrência de vários tipos de câncer, como de nasofaringe (PENG et al., 2015), mama (JULIN et al., 2012a), próstata (JULIN et al., 2012b) e pulmão (NAWROT et al., 2006).

Estudos que avaliam a concentração de poluentes no sangue materno e no sangue do cordão umbilical mostram que o Cd atravessa a barreira placentária e atinge o embrião/feto em desenvolvimento (RONCO; ARGUELLO; GRAS, 2005; RUDGE et al., 2009). As concentrações de Cd encontradas em sangue materno humano em geral vão de 0,233 a 8,5 ng/ml, enquanto que no cordão, a concentração mínima foi de 0,2 e a máxima de 7,5 ng/ml (WALKER et al., 2006; AL-SALEH et al., 2011; SUN et al., 2014). Além da exposição *in utero*, lactentes são constantemente expostos ao Cd através do leite materno (MOUSSA, 2011; CARDOSO et al., 2014; OLSZOWSKI et al., 2016).

Além de ser tóxico para organismos adultos, estudos têm demonstrado que o Cd afeta o desenvolvimento embrionário, aumentando a mortalidade e causando teratogênese em diferentes animais. Em peixes, a exposição a esse metal ocasiona malformações no corpo e no

coração, além de alterar o ritmo cardíaco (ZHU et al., 2014). Foi demonstrado que em ratos a exposição ao Cd durante a organogênese aumenta a ocorrência de anomalias no esqueleto e malformações fetais como fenda palatina (SALVATORI et al., 2004). Em camundongos, interfere de maneira dose-dependente na expressão de genes de resposta ao estresse envolvidos com parada do ciclo celular, danos ao DNA, estresse oxidativo e vias relacionadas com apoptose (ROBINSON et al., 2011). Além de se acumular na placenta, o Cd interfere no transporte de nutrientes para o feto, prejudicando seu crescimento (KIPPLER et al., 2010).

Trabalhos também evidenciaram os efeitos do Cd em embrião de ave *Gallus gallus*. Thompson e colaboradores (2005) demonstraram, em embriões de *Gallus gallus* expostos ao Cd nos estádios 16 e 17, a relação entre este metal e a ocorrência de defeito na parede do corpo e morte celular por apoptose em células dos somitos, placa lateral da mesoderme e tubo neural, iniciando após 4 horas de exposição. Posteriormente, Thompson e Bannigan (2007) caracterizaram, em embriões expostos ao Cd com 60 horas de incubação, o desenvolvimento de um defeito na parede do corpo, semelhante à onfalocele humana, que poderia ocorrer devido à alteração na expressão de DNA metiltransferase, enzima responsável pela metilação do DNA, envolvida na regulação gênica também durante a embriogênese (DOI et al., 2011). Em 2012, Yamamoto e colaboradores avaliaram o efeito da exposição ao Cd através da análise de biomarcadores bioquímicos e morfológicos. Nesse estudo, a taxa de sobrevivência dos embriões foi reduzida significativamente nos indivíduos do grupo exposto à maior concentração (5 µg/ml) quando comparada com o grupo controle. Não houve alteração significativa na atividade de enzimas antioxidantes, porém foram observadas alterações morfológicas na região cefálica, parede do corpo, coração, tubo neural, notocorda, vesículas ópticas e auditivas. Portanto, o Cd é reconhecidamente um agente embriotóxico em diversas espécies.

1.2 POLUENTES EMERGENTES

Poluentes emergentes são substâncias que possuem potencial tóxico, porém seus efeitos ainda não são bem elucidados (SORENSEN et al., 2015) e por isso muitas vezes ainda não estão inclusos em programas de monitoramento ou mesmo regulamentado pelas agências de controle ambiental (GLASSMEYER, 2007). Esse conceito engloba compostos recém-sintetizados ou mesmo antigos e seus metabólitos. Os compostos antigos são os de uso mais frequente e que por isso estão presentes no ambiente há muito tempo, porém sua importância

toxicológica começou a ser estudada mais recentemente. São classificados também como emergentes os compostos ou elementos que já possuem efeitos biológicos conhecidos, porém descobertas sobre outros efeitos, ocorrência e destino trazem novos focos de estudo (DAUGHTON, 2004). Sendo assim, o ambiente encontra-se contaminado por uma grande diversidade de poluentes emergentes onde alguns são liberados há muito tempo enquanto outros são encontrados em concentrações muito baixas (BATTAGLIN et al., 2007). Avanços nas técnicas de análise química proporcionaram uma maior sensibilidade na detecção desses baixos níveis de poluentes emergentes, entretanto, muitos ainda não são detectados quimicamente (KÜMMERER, 2011).

Exemplos de poluentes emergentes são os medicamentos, produtos de higiene (perfumes, creme dental, shampoo, desodorante), cosméticos, detergentes, desinfetantes, surfactantes, retardantes de chamas e nanomateriais (KÜMMERER, 2011). Esses produtos têm sido liberados no ambiente desde que começaram a ser produzidos e utilizados, porém existe uma recente e crescente preocupação dos pesquisadores quanto à sua presença nos ecossistemas hídricos e terrestres. Ou seja, é emergente também o interesse nos efeitos que esses compostos podem causar como contaminantes ambientais (GLASSMEYER, 2007).

1.3 COMPOSTOS PERFLUORADOS

Os compostos perfluorados (PFCs) são considerados poluentes organopersistentes emergentes, possuem capacidade de bioacumulação e são potencialmente tóxicos aos humanos e à biota de modo geral (CALAFAT et al., 2007; AHRENS, 2011; ARVANITI; STASINAKIS, 2015). Devido à sua estabilidade térmica e química e sua natureza anfipática, têm sido muito utilizados em diversos artigos de aplicação industrial e doméstica, como surfactantes, emulsificantes, espumas contra incêndio, inseticidas, embalagens de alimentos, produtos para tratamento de superfícies, revestimentos repelentes de água, gordura, sujeira e tinta, em tapetes, tecidos, couros e papel (BEGLEY et al., 2008; BUCK et al., 2011; DOMINGO, 2012).

As fontes de contaminação ambiental por poluentes dessa classe podem ser direta, como consequência da produção, uso e eliminação de produtos que contenham PFCs, ou indireta, pela degradação de moléculas de PFCs precursoras (PREVEDOUROS et al., 2006). Uma vez no ambiente, esses compostos são transportados por correntes marítimas e atmosféricas atingindo mesmo regiões remotas do planeta como o polo Ártico (DREYER et

al., 2009; AHRENS, 2011; ZHAO et al., 2012). Os PFCs mais encontrados no ambiente são o ácido perfluorooctanóico, também conhecido como perfluooctanoato (PFOA) e o perfluorooctano sulfonato (PFOS), uma vez que muitos PFCs com cadeias carbônicas maiores são degradados gerando o PFOA e PFOS no ambiente (ARVANITI; STASINAKIS, 2015).

1.4 ÁCIDO PERFLUOOCTANÓICO (PFOA)

O PFOA é muito conhecido pelo seu uso na produção do Teflon®, tintura que reveste alguns utensílios de cozinha (BETTS, 2007).

A exposição humana ao PFOA ocorre principalmente por via oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados, mas pode também ocorrer pela via respiratória, através da inalação de poeira ou pelo ar em ambientes domésticos (FROMME et al., 2009; MURRAY et al., 2010; HEO et al., 2014; SCHWANZ, 2016). Estudos mostram que o PFOA migra facilmente das embalagens para os alimentos (BEGLEY et al., 2008; TRIER; GRANBY; CHRISTENSEN, 2011; XU; NOONAN; BEGLEY, 2013). Segundo o Departamento de Saúde do Governo Australiano (2017), a ingestão diária aceitável de PFOA é de 160 ng/kg de peso corporal. Para a água potável, a concentração limite é de 0,56 µg/l de água. Diferente de outros poluentes orgânicos com característica lipofílica, o PFOA não se acumula principalmente no tecido adiposo, mas se liga a proteínas do sangue e entra na circulação enterohepática, acumulando-se preferencialmente no fígado e no sangue (JOHNSON et al., 1984; JONES et al., 2003). Em humanos, a meia vida biológica do PFOA é de aproximadamente 2,3-3,8 anos (OLSEN et al., 2007; BARTELL et al., 2010).

Em animais, o PFOA é classificado como carcinogênico, causando câncer testicular, hepático e pancreático (BIEGEL et al., 2001). Efeitos relacionados à desregulação endócrina e imunotoxicidade também já foram descritos (DEWITT et al., 2008; WHITE; FENTON; HINES, 2011) e em humanos, a exposição ao PFOA está relacionada com elevados níveis de colesterol e ácido úrico (STEENLAND et al., 2010). Os mecanismos associados ao efeito tóxico do PFOA ainda não foram completamente esclarecidos, porém um dos mecanismos identificados em embrião de ave é a ativação de um receptor nuclear, o PPAR- α (JIANG et al., 2012). Esse receptor participa da regulação do metabolismo de lipídeos (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012) e tem efeito neuroprotetor (AVAGLIANO et al., 2016).

Já foi demonstrado que o PFOA é capaz de atravessar a barreira placentária. Estudos que avaliaram a concentração desse composto em sangue materno humano e sangue de cordão

umbilical mostram que a transferência placentária é de aproximadamente 76-86% (MONROY et al., 2008; LEE et al., 2013).

A exposição ao PFOA durante o desenvolvimento embrionário é prejudicial em diferentes espécies. Em camundongos, atrasa o desenvolvimento, a abertura dos olhos e o crescimento dos pelos, reduzindo a sobrevivência e o peso ao nascer e dificultando também o ganho de peso pós-natal (WOLF et al., 2007). Em peixes, este composto se acumula em oócitos, se ligando a proteínas do vitelo e gerando riscos de efeitos adversos no desenvolvimento inicial e na saúde da prole, como alterações no crescimento e o aumento na mortalidade (WANG et al., 2011; ULHAQ et al., 2015).

Alguns estudos revelam os efeitos do PFOA em *Gallus gallus*. Yeung e colaboradores (2007) mostraram que a exposição de galinhas ao PFOA, via implantação subcutânea de bomba de infusão osmótica, altera a expressão de genes hepáticos relacionados ao transporte de elétrons, oxigênio e íons, metabolismo de lipídeos, fosforilação e proteólise. Em embriões expostos ao PFOA *in ovo* foi observada teratogenicidade neurocomportamental (PINKAS et al., 2010). Além de neurotóxico, o PFOA é cardiotoxico em embriões de *Gallus gallus*, provocando alterações em vários parâmetros estruturais e funcionais do coração, como espessura e volume do ventrículo esquerdo, frequência cardíaca e volume sistólico (JIANG et al., 2012).

A Convenção de Estocolmo é um tratado internacional assinado em 2001 que visa reduzir ou eliminar a produção, comercialização e uso de substâncias classificadas como poluentes organopersistentes. O PFOA ainda não está incluso neste tratado como uma substância a ser banida. Em 2006, o EPA firmou um acordo com os maiores produtores mundiais de PFOA para que sua produção e de seus precursores fossem reduzida em 95% e cessada até 2015. Todas as empresas cumpriram o objetivo do acordo, porém os relatórios das oito empresas participantes ainda estão em análise (EPA, 2017). Em abril de 2015, a União Europeia apresentou uma proposta de inclusão do PFOA na lista do anexo A da Convenção de Estocolmo, juntamente com outros compostos orgânicos que devem ser eliminados. O Brasil aprovou a Convenção de Estocolmo por meio do Decreto Legislativo nº 204, de 7 de maio de 2004, e publicou o texto da Convenção em 2005, via o Decreto nº 5.472, de 20 de junho de 2005 (Ministério do Meio Ambiente, 2015), mas ainda não apresenta normas que regulamentam a presença destes compostos no ambiente. No entanto, pelo fato de ser altamente persistente, mesmo se banido, suas moléculas estarão presentes e biodisponíveis para a biota e populações humanas ainda por muitos anos.

1.5 MISTURAS DE POLUENTES

De forma geral, os organismos vivos encontram-se expostos no ambiente natural a uma mistura complexa de poluentes, representados por uma grande variedade de moléculas e substâncias químicas, provenientes de diversas fontes. Sendo assim, o comportamento tóxico desses compostos em mistura pode de forma aditiva, sinérgica ou antagônica alterar a biodisponibilidade e as relações cinéticas com a célula, interferindo no potencial tóxico do poluente, se comparado com a exposição isolada (SOFTELAND et al., 2014). Glinski e colaboradores (2016) demonstraram que a exposição de macrófagos peritoneais a misturas de nanopartículas e pesticidas organoclorados gera efeitos diferenciados dos observados na exposição isolada. Em fitoplâncton marinho foi demonstrado que misturas complexas de poluentes são mais tóxicas quando comparadas com a exposição a misturas simples ou aos compostos isolados (ECHEVESTE et al., 2016). Por outro lado, misturas binárias de trifenilestanho (TPT)/tributilestanho (TBT) e TPT/cobre geram efeitos antagônicos em diferentes organismos marinhos (YI; BAO; LEUNG; 2017). Portanto, a avaliação do potencial tóxico de misturas de poluentes permite simular de maneira mais realística uma exposição ambiental, por fornecer informações sobre as complexas interações entre as substâncias e os efeitos na saúde humana e animal. No entanto, este é um dos grandes desafios da ecotoxicologia, pois se trata de uma abordagem complexa, de difícil reprodução experimental e, por isso, ainda pouco explorada.

1.6 EMBRIOTOXICOLOGIA

O desenvolvimento humano pré-natal pode ser considerado como o período mais sensível ao efeito de poluentes ambientais, pois nesse estágio há uma alta taxa de proliferação e diferenciação celulares, ao mesmo tempo em que os sistemas de destoxificação ainda não estão completamente desenvolvidos. De acordo com Wells e colaboradores (2010), estas características tornam o feto mais sensível que os adultos a agentes externos. Essa sensibilidade está relacionada a existência de períodos críticos no desenvolvimento, em que os embriões/fetos estão mais susceptíveis à morte e ao aparecimento de anomalias congênitas. A ação de agentes externos no período até a terceira semana torna o embrião mais susceptível à morte, enquanto que nas fases entre a terceira e oitava semanas, correspondentes à organogênese, é alto o risco da ocorrência de malformações congênitas (RUTLEDGE, 1997;

SADLER, 2016). A placenta provém nutrientes e oxigênio ao embrião/feto em desenvolvimento e funciona como uma barreira de proteção, porém muitos xenobióticos, como o Cd e o PFOA, conseguem ultrapassar essa barreira (VIZCAINO et al., 2014) em níveis capazes de causar efeitos nas fases subsequentes do desenvolvimento do feto, que irão se refletir na infância ou mesmo na vida adulta do indivíduo (BOEKELHEIDE et al., 2012). Dessa forma, a exposição a contaminantes ambientais *in utero* é um importante problema de saúde pública.

Assim sendo, é relevante estudar os efeitos desses xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário de vertebrados, o que possibilita um estudo indireto desses efeitos sobre fetos humanos, uma vez que estes são inviabilizados diretamente em embriões humanos. O uso de modelos animais passa então a ser uma alternativa para o estudo dos efeitos de xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário e os possíveis efeitos tardios da exposição nos estágios do ciclo de vida subsequentes.

1.7 EMBRIÃO DE AVE *Gallus gallus* COMO MODELO PARA A EMBRIOTOXICOLOGIA

Historicamente, as aves constituem um modelo que vem sendo bastante utilizado em experimentos de laboratório no estudo de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento (DUPIN; ZILLER; LE DOUARIN, 1997; DAVEY et al., 2007; KANNO; ESPREAFICO; YAN, 2014). Várias têm sido as vantagens descritas para o uso deste modelo quando comparado com outras espécies, como a facilidade de obtenção, observação, manipulação, desenvolvimento curto e independência materna, além de ter seu desenvolvimento bem descrito e classificado em estádios (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Assim como no desenvolvimento humano, o de *Gallus gallus* também apresenta períodos críticos. Segundo Christensen (2001), o primeiro corresponde ao período pré-oviposital, com duração de 18 a 20 horas, de intensa proliferação celular, em que diversas condições maternas, como temperatura no oviduto e o estado nutricional da mãe, influenciam na mortalidade dos embriões. O segundo compreende o tempo de pré-incubação, em que o desenvolvimento é estacionado e só é retomado quando o ovo é submetido às condições normais de incubação ($\pm 38^{\circ}\text{C}$). Durante esse tempo, os parâmetros de umidade, ventilação, temperatura e o tempo entre a oviposição e a incubação têm influência na viabilidade embrionária. Segundo Decuypere e Michels (1992), as condições ideais de estocagem de ovos

férteis por até 4 dias são em temperaturas entre 19 e 22°C, com a câmara de ar voltada para cima. O terceiro, quarto e quinto períodos críticos se passam durante o tempo de incubação. Do primeiro ao quarto dias (terceiro período) o embrião se adapta às condições de incubação e são retomadas a proliferação e diferenciação celulares. É nesse período que ocorre a organogênese, formação inicial dos órgãos (BELLAIRS; OSMOND, 2005), e a sensibilidade à temperatura e exposição a agentes tóxicos é alta. O quarto período vai do 5º ao 18º dia e o quinto do 19º ao 21º dia.

Além disso, alguns estágios do desenvolvimento do embrião de galinha são molecular e morfológicamente semelhantes aos de outros vertebrados, em um período do desenvolvimento denominado estágio filotípico, que acontece durante a organogênese (IRIE; KURATANI, 2011; HILL, 2017). Essas semelhanças morfológicas são consequência da expressão de genes altamente conservados entre as espécies, entre eles os genes da família *Hox*, o que gera um padrão corporal semelhante (SLACK; HOLLAND; GRAHAM, 1993; IRIE; KURATANI, 2011). Nesse estágio, todos apresentam características que os tornam muito parecidos e exibem especificidades de embriões de cordados como tubo neural, somitos, coração ventral e arcos faríngeos (SLACK, 2006). No embrião de *Gallus gallus*, os estádios 16-19 estão inclusos nesse período, correspondendo aproximadamente à quarta/quinta semana de gestação humana (SADLER, 2016; HILL, 2017). Devido a essas similaridades, o estudo de alterações morfológicas causadas por xenobióticos nesse período de desenvolvimento do embrião de *G. gallus* nos permite inferir o risco de exposição em outras espécies de vertebrados, inclusive em humanos. Vários estudos apontam o embrião de galinha como um modelo promissor nos estudos de embriotoxicidade, onde alguns biomarcadores como os moleculares (THOMPSON et al., 2010; DOI et al., 2011), bioquímicos (HADANI; EGYED, 1967; BRUNSTRÖM, 1992; WANG, Y.-M.; WANG, H.-J.; PENG, 2008; YAMAMOTO et al., 2012) e morfológicos (VAN STEENIS; VAN LOGTEN, 1971; YAMAMOTO et al., 2012) têm sido empregados.

Os biomarcadores são definidos por Peakall (1994) como "mudanças mensuráveis de uma resposta biológica, que pode ser molecular, bioquímica, celular, fisiológica ou comportamental, estando esta relacionada aos efeitos tóxicos de exposição a xenobióticos". A avaliação destes parâmetros é importante porque permite prever através do determinado efeito a relação com danos biológicos ou doença que possa comprometer o indivíduo, a população ou mesmo uma comunidade de organismos vivos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987). Esse diagnóstico preditivo é possível porque alterações em níveis inferiores de organização biológica funcionam como alertas precoces do aparecimento do efeito de

respostas mais tardias em níveis mais complexos de organização biológica (BAYNE et al., 1985 *apud* VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.8 JUSTIFICATIVA

Visto que o Cd e o PFOA são poluentes presentes no ambiente, sendo persistentes, bioacumuláveis e capazes de vencer a barreira placentária, a análise de seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário deve ser intensificada. Estudos revelam alterações morfológicas, imunes, neurais e cardíacas como consequência da exposição pré-natal a esses contaminantes, porém existe uma lacuna dos efeitos em períodos mais iniciais do desenvolvimento e que permitam um grau de extrapolação entre as espécies. Além disso, já foi demonstrada a sua presença em sangue de cordão umbilical, revelando que indivíduos em desenvolvimento sofrem uma exposição concomitante a esses poluentes (NEEDHAN et al., 2011). Porém, não há trabalhos que relacionem a interação desses dois contaminantes e as possíveis consequências ao desenvolvimento e à saúde do embrião/feto.

O estudo dos efeitos do Cd sobre o desenvolvimento embrionário já foi explorado em trabalhos anteriores em nosso laboratório, porém ainda existem lacunas. O efeito do PFOA sobre o desenvolvimento embrionário inicial ainda não foi estudado. Tendo em vista a falta de informações sobre a toxicidade do PFOA, as lacunas a respeito da embriotoxicidade do Cd e a importância de se conhecer os efeitos de misturas de poluentes, o presente trabalho prevê uma comparação entre os efeitos do Cd e PFOA, isoladamente e em mistura, observados nos embriões de ave *Gallus gallus*, com os potenciais efeitos sobre embriões humanos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o risco de exposição a dois poluentes, cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA), de forma isolada e em mistura, no desenvolvimento de embriões de *Gallus gallus*, com 72 horas de incubação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a frequência cardíaca como biomarcador fisiológico frente à exposição ao Cd e PFOA;
- Identificar a biodisponibilidade do Cd nos embriões, através de microscopia de fluorescência confocal.
- Analisar os efeitos nos embriões da exposição ao Cd e PFOA, através de avaliações morfológicas estereoscópicas e de mortalidade;
- Investigar se o Cd e o PFOA causam alterações no crescimento e na morfogênese embrionária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), sob o certificado de número 974, processo 23075.085222/2015-19.

3.1 MODELO BIOLÓGICO

Os ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram doados pela empresa Seara (JBS), situada na região metropolitana de Curitiba. No laboratório, os ovos foram selecionados, os que apresentaram rachaduras foram descartados e os demais higienizados com papel toalha umedecidos com etanol 70%. Em seguida foram pesados, selecionados (entre 60 e 65 g) e identificados de acordo com os grupos experimentais (Tabela 1).

TABELA 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupos experimentais	Ovos
Grupo Controle	não injetados
Controle veículo	NaCl 0,9%
Grupo Exposto I	CdCl ₂ [Cd]* = 0,5 µg/ml
Grupo Exposto II	CdCl ₂ [Cd]* = 5 µg/ml
Grupo Exposto III	CdCl ₂ [Cd]* = 25 µg/ml
Grupo Exposto IV	PFOA 5 ng/ml
Grupo Exposto V	PFOA 50 ng/ml
Grupo Exposto VI	PFOA 250 ng/ml
Grupo Exposto VII	CdCl ₂ 0,5 µg/ml+ PFOA 5 ng/ml

*[Cd] se refere a concentração final de Cd na solução de CdCl₂ injetada. FONTE: A autora (2017).

As concentrações de Cd utilizadas foram determinadas a partir de estudos anteriores que utilizaram o embrião de galinha como modelo para estudo dos efeitos do Cd, os quais mostraram que essas doses podem causar anormalidades no embrião em estádios mais avançados (THOMPSON et al., 2005; THOMPSON; BANNIGAN, 2007; THOMPSON et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2012).

As concentrações de PFOA utilizadas estão baseadas no que foi encontrado no sangue do cordão umbilical humano, simulando uma exposição pré-natal e uma comparação com os efeitos provocados pelo Cd. Estudos mostram que a concentração média de PFOA no cordão umbilical varia de 0,36 a 7,73 ng/ml de sangue (MONROY et al., 2008; ARBUCKLE et al., 2013; HANSSEN et al., 2013; LEE et al., 2013; LIEN et al., 2013; WANG et al., 2016).

A menor concentração de PFOA testada corresponde à média das concentrações encontradas no cordão umbilical humano.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os embriões foram divididos em 9 grupos, como observado na Tabela 1. As soluções dos contaminantes utilizadas para a exposição foram preparadas diluindo-se o cloreto de cádmio (CdCl_2) (Alfa Aesar) e o PFOA (Sigma-Aldrich) em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (ADV Farma). Foram utilizados dois grupos controle, um fechado (sem manipulação) e um veículo (injetado com NaCl 0,9%), para verificar se a injeção nos ovos interferiria nos parâmetros analisados.

Para a coleta dos embriões para as análises da mortalidade, frequência cardíaca, morfologia e morfometria foram realizados 8 experimentos com o Cd, 8 com o PFOA e 8 com a mistura. Cada lote de ovos recebido consistiu em um experimento independente. Em cada experimento foram incubados pelo menos 5 ovos em cada grupo experimental, totalizando 563 ovos. Primeiramente foram realizados os experimentos com o Cd, utilizando-se os controles fechado e veículo. Posteriormente foram realizados os com o PFOA, também com os dois controles. Por último, foi utilizada a mistura dos dois contaminantes, somente com o controle veículo.

Para a análise da biodisponibilidade do Cd foram realizados 3 experimentos. Em cada experimento incubou-se 3 ovos em cada grupo controle (fechado e veículo), 6 em cada um dos 3 grupos contaminados com Cd, além de 6 no grupo mistura, totalizando 90 ovos.

A Tabela 2 resume os dados de número de ovos, peso médio dos ovos e dose média injetada por grupo experimental. Para a determinação da dose média foi calculada a quantidade de contaminante (Cd e PFOA) no volume injetado, dividida pelo peso dos ovos. A dose média foi calculada para constatar a quantidade de contaminante injetada por grama de ovo, uma vez que o peso variava entre 60 e 65 g.

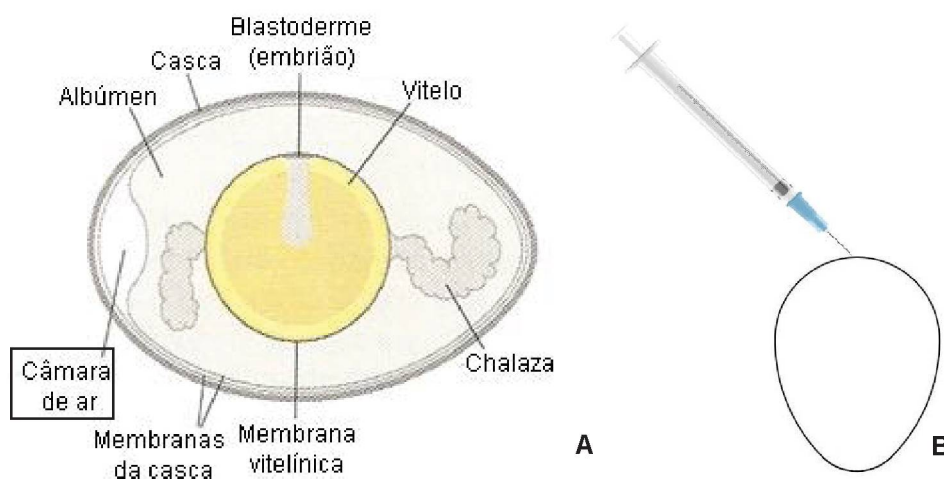
TABELA 2 – RELAÇÃO DOS OVOS UTILIZADOS: NÚMERO, PESO MÉDIO E DOSE MÉDIA DE CONTAMINANTE INJETADA POR GRUPO EXPERIMENTAL.

Grupo	Número de ovos	Peso médio (g)	Dose média (g de contaminante/g de ovo)
Montagem total			
Controle fechado	89	63,77 (7,21)	-
Controle veículo	139	62,57 (2,33)	-
Cádmio 0,5 µg/ml	50	62,70 (1,74)	$1,79 \times 10^{-16}$ ($6,81 \times 10^{-19}$)
Cádmio 5 µg/ml	55	62,49 (2,02)	18×10^{-16} ($8,06 \times 10^{-18}$)
Cádmio 25 µg/ml	52	62,22 (1,95)	90×10^{-16} ($3,98 \times 10^{-17}$)
PFOA 5 ng/ml	42	63,02 (1,73)	$1,59 \times 10^{-13}$ ($6,16 \times 10^{-16}$)
PFOA 50 ng/ml	42	62,89 (1,65)	$17,8 \times 10^{-13}$ ($1,27 \times 10^{-13}$)
PFOA 250 ng/ml	47	62,42 (1,55)	80×10^{-13} ($2,7 \times 10^{-14}$)
Cádmio 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml	47	62,26 (1,51)	$1,8 \times 10^{-16}$ (6×10^{-19}) e $1,6 \times 10^{-13}$ ($5,33 \times 10^{-16}$)
	563		
Presença do cádmio			
Controle fechado	9	59,63 (2,05)	-
Controle veículo	9	60,26 (2,52)	-
Cádmio 0,5 µg/ml	18	60,49 (1,12)	$1,81 \times 10^{-16}$ ($1,75 \times 10^{-18}$)
Cádmio 5 µg/ml	18	61,44 (1,88)	18×10^{-16} ($5,82 \times 10^{-17}$)
Cádmio 25 µg/ml	18	61,97 (1,33)	90×10^{-16} ($2,42 \times 10^{-17}$)
Cádmio 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml	18	62,60 (1,60)	$1,76 \times 10^{-16}$ ($8,68 \times 10^{-19}$) e $1,59 \times 10^{-13}$ ($6,29 \times 10^{-16}$)
	90		
TOTAL	653		

FONTE: A autora (2017).

3.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO

Os embriões foram expostos aos contaminantes no fluxo laminar. Para isso, perfurou-se a casca com uma agulha (1,60 x 40 mm) e injetou-se, com seringa e agulha (0,3 x 8 mm), um volume de 20 µl, de solução salina ou do (s) contaminante (s) diretamente na câmara de ar (Figura 1), local que permite melhor dispersão do contaminante no embrião (YAMAMOTO et al., 2012).

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO OVO DE *Gallus Gallus*

A: Indicação de suas partes. FONTE: modificado de WOLPERT et al. (2008). B: Injeção do contaminante na câmara de ar. FONTE: A autora (2017).

Após a injeção os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados com a câmara de ar voltada para cima, dispostos aleatoriamente nas bandejas e incubados por 72 horas em incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica) (Figura 2), sob temperatura controlada a 38°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e umidade e ventilação constantes. Neste tempo de incubação não houve necessidade da viragem dos ovos.

FIGURA 2 - POSICIONAMENTO DOS OVOS INCUBADOS EM BOD

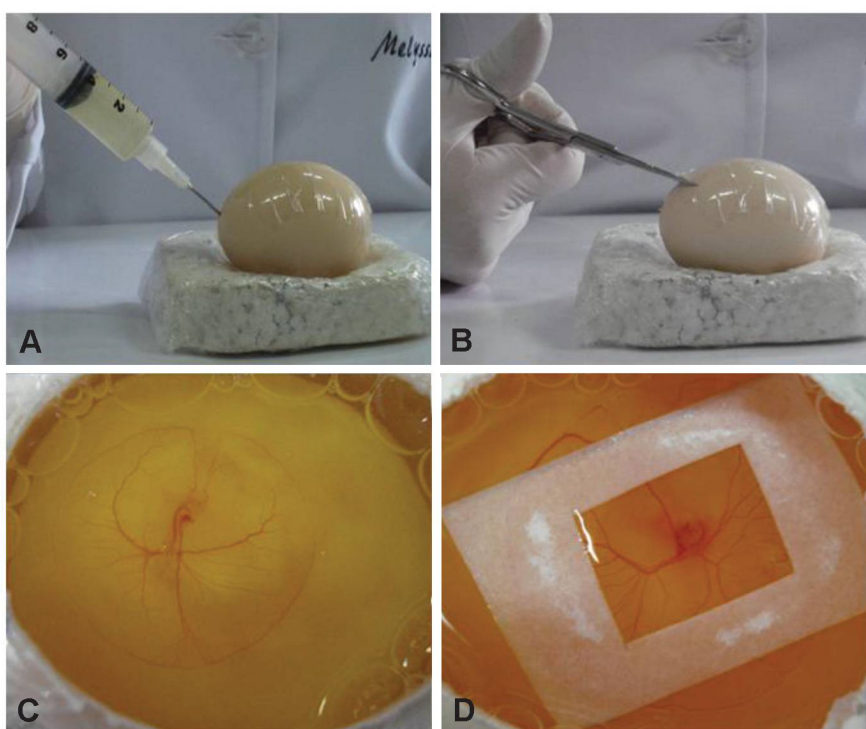


FONTE: A autora (2017).

3.4 ABERTURA DOS OVOS

Após 72 horas de incubação, os ovos foram abertos pelo método da janela (KORN; CRAMER, 2007). Inicialmente, 5 minutos antes da abertura, os ovos foram colocados na posição horizontal na incubadora, para que o embrião se posicionasse na lateral do ovo voltada para cima, possibilitando a sua visualização pela janela. Esse posicionamento do embrião é possível devido a ligação existente entre a membrana vitelínica e a calaza, que permite que o vitelo gire, mantendo o embrião sempre no topo. Após a retirada dos ovos da incubadora, uma fita adesiva foi colada na casca no local onde é feita a abertura. Um pouco do albúmen foi retirado (5 ml) (Figura 3A) e com o auxílio de tesoura foi realizada uma abertura na casca de aproximadamente 6 cm² (Figura 3B) para observação e acesso aos embriões. Os embriões foram fotografados *in ovo* (Figura 3C) e um papel filtro com um recorte em retângulo na região central foi encaixado sobre o embrião vivo para mantê-lo distendido (Figura 3D) e, posteriormente, imerso na solução fixadora.

FIGURA 3 - COLETA DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISE POR MONTAGEM TOTAL

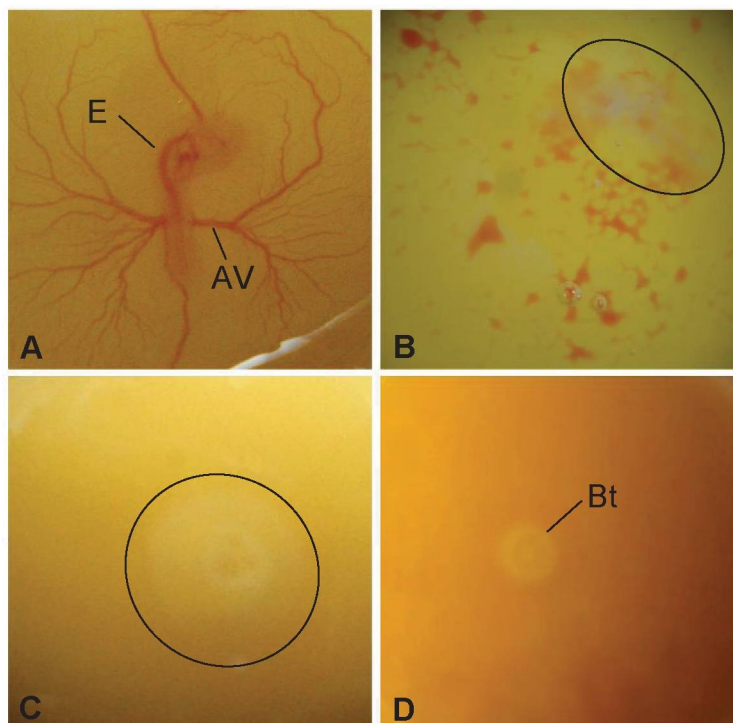


A: Retirada do albúmen. B: Abertura da casca. C: Visualização do embrião *in ovo*. D: Embrião distendido no papel filtro. FONTE: A autora (2017).

3.5 ANÁLISE DA MORTALIDADE

Após a abertura do ovo foi determinada a viabilidade dos embriões (Figura 4). Os mortos foram contabilizados para a taxa de mortalidade e descartados e os vivos coletados para as demais análises. Os embriões foram considerados vivos se apresentassem batimentos cardíacos, coloração rósea, bem como os vasos sanguíneos extraembrionários íntegros (Figura 4A). Foram considerados mortos os embriões que apresentavam: coloração esbranquiçada, ausência de batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários não íntegros (Figura 4B); ou disco embrionário mais desenvolvido que no momento da postura, com características de que o desenvolvimento foi retomado na incubação, porém foi interrompido antes das 72 hrs (Figura 4C). Além disso, alguns embriões não foram considerados para a análise de mortalidade, pois foram classificados como que não tiveram o desenvolvimento retomado na incubação (Figura 4D), sendo impossível determinar se a não retomada foi consequência da exposição ao contaminante ou das condições de transporte e armazenamento dos ovos.

FIGURA 4 - VIABILIDADE DOS EMBRIÕES



A: Embrião vivo com 72 horas de incubação. B: Embrião morto. C: Embrião morto. D: Embrião que não teve o desenvolvimento retomado durante a incubação. E: Embrião. AV: Artéria vitelínica. Área circulada: Embrião morto. Bt: Blastoderme. FONTE: A autora (2017).

3.6 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

No terceiro dia de incubação o embrião já apresenta batimentos cardíacos. Assim, após a abertura do ovo, foi avaliada a frequência cardíaca dos embriões vivos. Foram cronometrados 15 segundos e os batimentos contabilizados nesse tempo foram multiplicados por 4 para verificar o número de batimentos por minuto.

3.7 BIODISPONIBILIDADE DO CÁDMIO

A observação da presença de Cd nos embriões foi realizada utilizando-se o corante fluorescente LeadmiumTM Green AM dye (excitação 490nm, emissão 520nm). O corante entra na célula e tem seu grupo acetoximetil clivado, gerando a forma carregada do corante, que se torna fluorescente na presença de níveis micromolares de Cd (LIFE TECHNOLOGIES, 2007).

Foram realizados 3 experimentos, sendo que cada lote de ovos recebido consistiu em um experimento independente. Por experimento foram incubados 3 ovos em cada grupo controle (fechado e veículo), 6 em cada um dos 3 grupos contaminados com Cd e 6 no grupo mistura, totalizando 90 ovos. Para a análise foram utilizados, por experimento, 2 embriões para o branco, 2 embriões controle (solução salina 0,9%) e 2 embriões de cada grupo exposto (Cd 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml e Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml), totalizando 6 embriões por grupo. A solução estoque foi preparada adicionando 50 µl de DMSO ao vial contendo 50 µg de LeadmiumTM Green AM dye. Para a solução de uso foi adicionado 50 µl de solução estoque de LeadmiumTM Green AM dye e 450 µl de solução salina 0,9%. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz. Após a injeção, os ovos foram incubados por 66 horas e, então, foi realizado o mesmo procedimento para a abertura do ovo descrito no item 3.4, porém com uma abertura menor, aproximadamente 2,25 cm². Após a abertura e visualização do embrião vivo, foram adicionados 80 µl de solução de uso do marcador, por gotejamento, diretamente sobre o embrião. A abertura foi, então, fechada com fita escura e o ovo incubado por mais 6 horas, ao abrigo da luz. Assim, o tempo total de incubação foi 72 horas. Após esse tempo, o embrião foi retirado do ovo, lavado em solução salina 0,9% e as membranas extraembrionárias retiradas. Após a lavagem, foi realizada a montagem total em lâmina elevada, com glicerol e lamínula. A lâmina elevada foi montada no laboratório colando-se tiras de plástico (embalagem de

sorvete) na lâmina, para permitir que os embriões não fossem achatados e a morfologia fosse preservada.

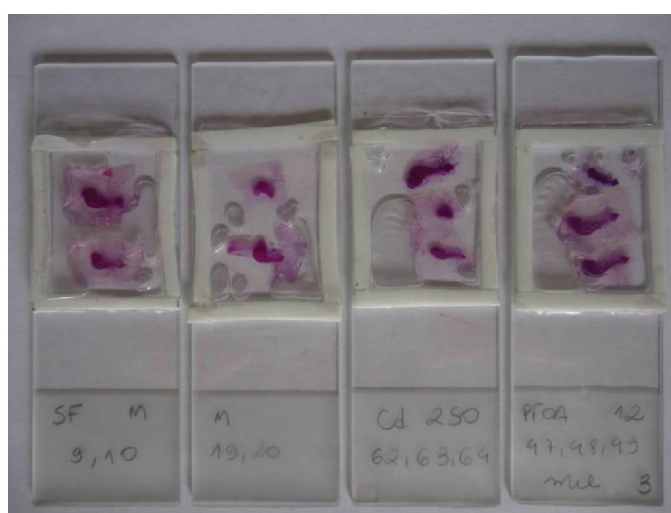
Todos os procedimentos foram realizados com as luzes do laboratório apagadas. As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal, modelo A1SiR+MP (Nikon, Tokio, Japão) e analisadas no software NIS - Elements Viewer 4.20.

3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a abertura dos ovos, verificação da viabilidade embrionária e contabilização da frequência cardíaca, os embriões vivos foram coletados para análise morfológica através da técnica de montagem total (Figura 5) (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Primeiramente foi gotejada solução fixadora Carnoy (60 % álcool absoluto, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) para endurecer o material e facilitar a coleta, e com o auxílio de pinça e tesoura, o embrião foi retirado do ovo e transferido para um recipiente com PBS, onde foi lavado e o excesso de vitelo retirado. Os embriões foram, então, fixados em Carnoy, por 2 horas, a temperatura ambiente, em placa de Petri fechada. A utilização dessa solução fixadora permite uma boa preservação do material e proporciona uma melhor tonalidade de coloração para a análise da morfologia (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Após o tempo de fixação, os embriões foram lavados em água destilada e colocados em etanol 70%, onde permaneceram por, pelo menos, 8 horas. Após, foram hidratados em água destilada por 10 minutos e corados com solução corante Carmalúmen de Mayer (Água destilada, Carmin - BHD Chemicals, Sulfato de alumínio e amônia - J. T. Baker Chemicals, ácido acético glacial), por 48 horas. Esse corante tem boa penetração e permite a coloração de estruturas espessas (ZIMMERMANN, 1903). Depois da coloração os embriões foram desidratados em série crescente de etanol - 70%, 90% e 95% (10 minutos cada), 100% I e 100% II (15 minutos cada) - e diafanizados com dois banhos de xilol (10 minutos cada). Para a realização da montagem em lâmina, o papel filtro foi retirado e os embriões foram cobertos com a resina Entellan® e lamínula. A lâmina utilizada foi elevada, colando-se tiras de plástico não sensível ao xilol (embalagem de sorvete) na lâmina, para permitir que os embriões não fossem achatados e a morfologia fosse preservada. A análise da morfologia embrionária foi realizada em microscópio estereoscópico (Tecnival, SQF-F), de acordo com os estádios descritos por Hamburger e Hamilton (1951) (Figura 6; Tabela 3). Foram observados principalmente os aspectos morfológicos das vesículas encefálicas, membros, vesículas ópticas e auditivas, tubo

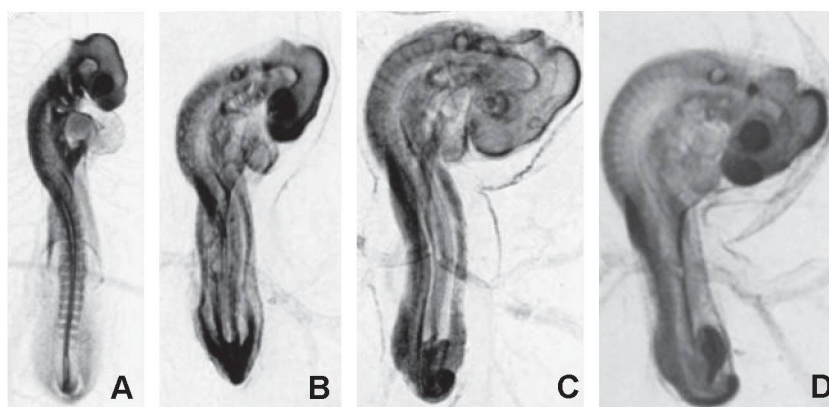
neural e curvatura do corpo. Essas estruturas foram selecionadas devido a facilidade de sua identificação nas lâminas de montagem total com a coloração utilizada. As malformações foram classificadas em: curvatura, tubo neural aberto, região encefálica, região caudal, parede do corpo aberta e intensas malformações. Os embriões com intensas malformações foram aqueles que não apresentaram um padrão de organização corporal normal, sendo impossível determinar a maioria das estruturas e o estágio embrionário. Além disso, os embriões contabilizados na classificação de intensas malformações foram classificados também nas malformações específicas.

FIGURA 5 - LÂMINAS DE MONTAGEM TOTAL DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus*



FONTE: A autora (2017).

FIGURA 6 - EMBRIÕES DE *G. gallus* em diferentes estádios de desenvolvimento



A: Estádio 16 (51-56 hrs). B: Estádio 17 (52-64 hrs). C: Estádio 18 (65-60 hrs). D: Estádio 19 (68-72 hrs).
FONTE: HAMBURGER; HAMILTON (1951).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS 16 AO 19

Estádios	Características
16	<ul style="list-style-type: none"> • Prega lateral do corpo se estende até os somitos 17-20. • Todas as flexuras se apresentam mais acentuadas que em estádios anteriores. • Rotação se estende até os somitos 14-15. • Broto da cauda curto, em cone ereto.
17	<ul style="list-style-type: none"> • Prega lateral do corpo se estende ao redor de toda a circunferência do corpo. • Os brotos dos membros se elevam da blastoderme pelo dobramento das pregas do corpo. • Flexura cranial semelhante ao estágio 16. • Flexura cervical mais inclinada que nos estádios anteriores. • Rotação se estende até os somitos 17-18. • Broto da cauda se inclina ventralmente. • Alantóide ainda não está formado.
18	<ul style="list-style-type: none"> • Somitos se estendem além dos brotos das pernas. • Brotos das pernas levemente maiores que o broto das asas. • Na flexura cervical, o eixo da medula forma aproximadamente um ângulo reto com o eixo do tronco posterior. • Broto da cauda se inclina para a direita.
19	<ul style="list-style-type: none"> • Somitos se estendem até a cauda. • Brotos dos membros simétricos. • Broto da cauda curvado, com a extremidade apontando para frente. • Na flexura cervical, o eixo da medula forma um ângulo agudo com o eixo do tronco posterior. • A flexura do tronco praticamente ou inteiramente desaparece devido a rotação do corpo inteiro. • Olhos não pigmentados.

FONTE: HAMBURGER; HAMILTON (1951).

3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica foi realizada a partir da foto documentação das lâminas de montagem total utilizada na análise morfológica. As mensurações foram realizadas no software Image-Pro Plus (MediaCybernetics), a partir de imagens capturadas em câmera Sony Cyber-shot DSC-W55 acoplada ao estereomicroscópio (Tecnival, SQF-F).

Com a finalidade de avaliar mais detalhadamente a morfologia dos embriões e verificar se os contaminantes interferiram no crescimento de estruturas embrionárias, foram estabelecidas algumas medidas com base na literatura (1-4) (DEY; MUKHERJEE; IYENGAR, 1999; KOBUS, 2007), porém adaptadas aos estádios embrionários utilizados. Além disso, foram estabelecidos dois parâmetros não relatados na literatura, em colaboração com o Laboratório de Estudos Morfométricos e Estereológicos do Departamento de Anatomia da UFPR (5 e 6). As medidas estabelecidas (Figura 7) foram:

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 6.0.

Os dados de mortalidade, morfologia e frequência cardíaca foram submetidos ao teste de normalidade D'agostino-Pearson. Os dados morfométricos foram submetidos ao teste de D'agostino-Pearson ou Kolmogorov-Smirnov, dependendo do "n" amostral obtido.

Posteriormente aos testes de normalidade foram utilizados:

- a) Para dados com distribuição normal: Teste t e ANOVA de uma via, com pós-teste de Dunnett e Tukey, quando aplicáveis;
- b) Para dados que não apresentaram distribuição normal: teste de Mann Whitney, teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn, quando aplicável.

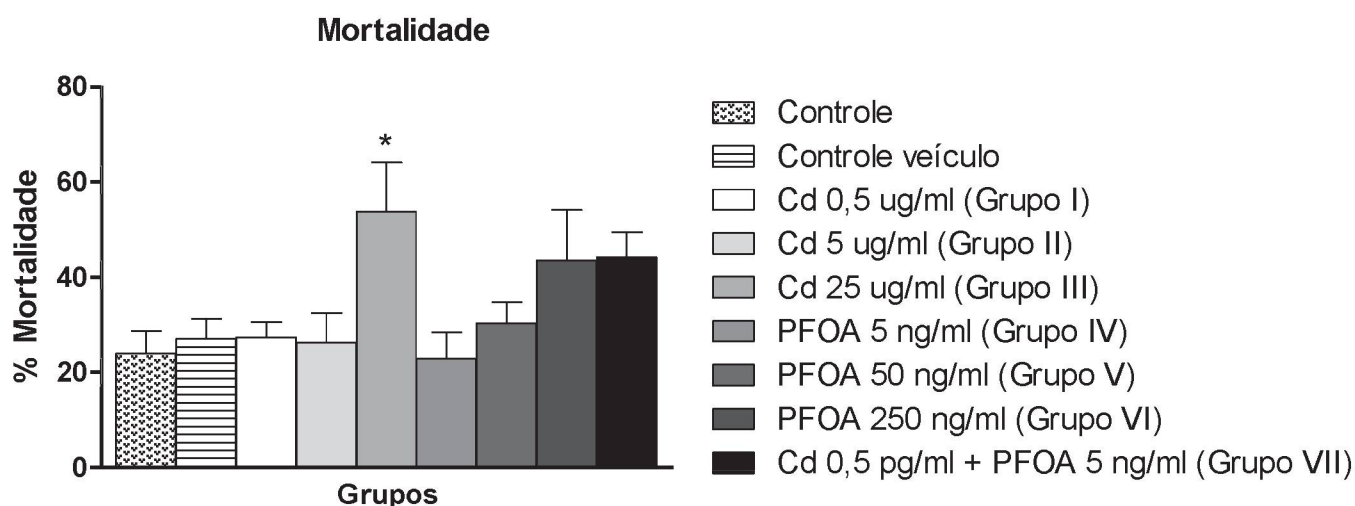
Os dados de malformações de sistema nervoso e estadiamento dos embriões foram analisados pelo Teste Exato de Fisher.

4. RESULTADOS

4.1 MORTALIDADE

A mortalidade dos embriões não foi afetada pela manipulação dos ovos (injeção), visto que não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle fechado e controle veículo, cujas taxas de mortalidade foram de 23,8% e 26%, respectivamente. Nos grupos expostos I (Cd 0,5 µg/ml), II (Cd 5 µg/ml) e III (Cd 25 µg/ml) a mortalidade dos embriões foi de 27,2%, 26,2% e 53,6%, sendo estatisticamente maior que no grupo veículo somente na maior concentração. Nos grupos expostos IV (PFOA 5 ng/ml), V (PFOA 50 ng/ml) e VI (PFOA 250 ng/ml) a porcentagem de embriões mortos no momento da abertura do ovo foi de 22,9%, 30,3% e 43,5%. Não houve diferença estatística entre os grupos expostos ao PFOA e o grupo veículo. No grupo exposto à mistura de Cd e PFOA a taxa de mortalidade dos embriões foi de 44,1%, maior, porém não estatisticamente diferente do veículo. Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos expostos. A taxa de mortalidade por grupo experimental está resumida na figura 8.

FIGURA 8 - TAXA DE MORTALIDADE POR GRUPO EXPERIMENTAL

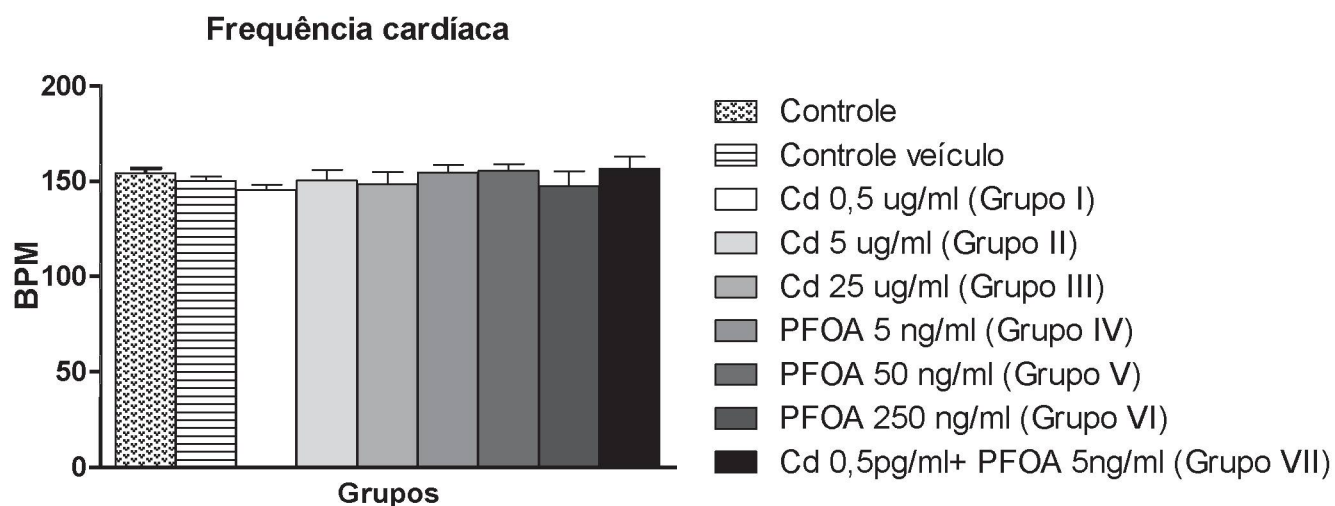


*Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,05$). Média e erro padrão. Controle $n=88$. Veículo $n=129$. Cd 0,5 µg/ml $n=47$. Cd 5 µg/ml $n=47$. Cd 25 µg/ml $n=47$. PFOA 5 ng/ml $n=40$. PFOA 50 ng/ml $n=42$. PFOA 250 ng/ml $n=45$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n=45$. FONTE: A autora (2017).

4.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Não houve alteração significativa na frequência cardíaca entre os grupos controle fechado e veículo, revelando que a manipulação dos ovos também não interfere na frequência cardíaca. Também não houve alteração significativa na frequência cardíaca dos embriões em nenhum dos grupos expostos (Figura 9). Nos embriões controle a média de batimentos cardíacos por minuto foi de 153 no fechado e 149 no veículo. Os embriões expostos ao Cd apresentaram frequência cardíaca média de 144, 150 e 148 bpm nos grupos expostos I, II e III, respectivamente. Já nos grupos IV, V e VI, a média da frequência cardíaca foi de 154, 155 e 147. No grupo exposto à mistura a média da frequência foi de 156 bpm. Não houve diferença estatística entre os grupos expostos.

FIGURA 9 - FREQUÊNCIA CARDÍACA EM BATIMENTOS POR MINUTO (BPM) POR GRUPO

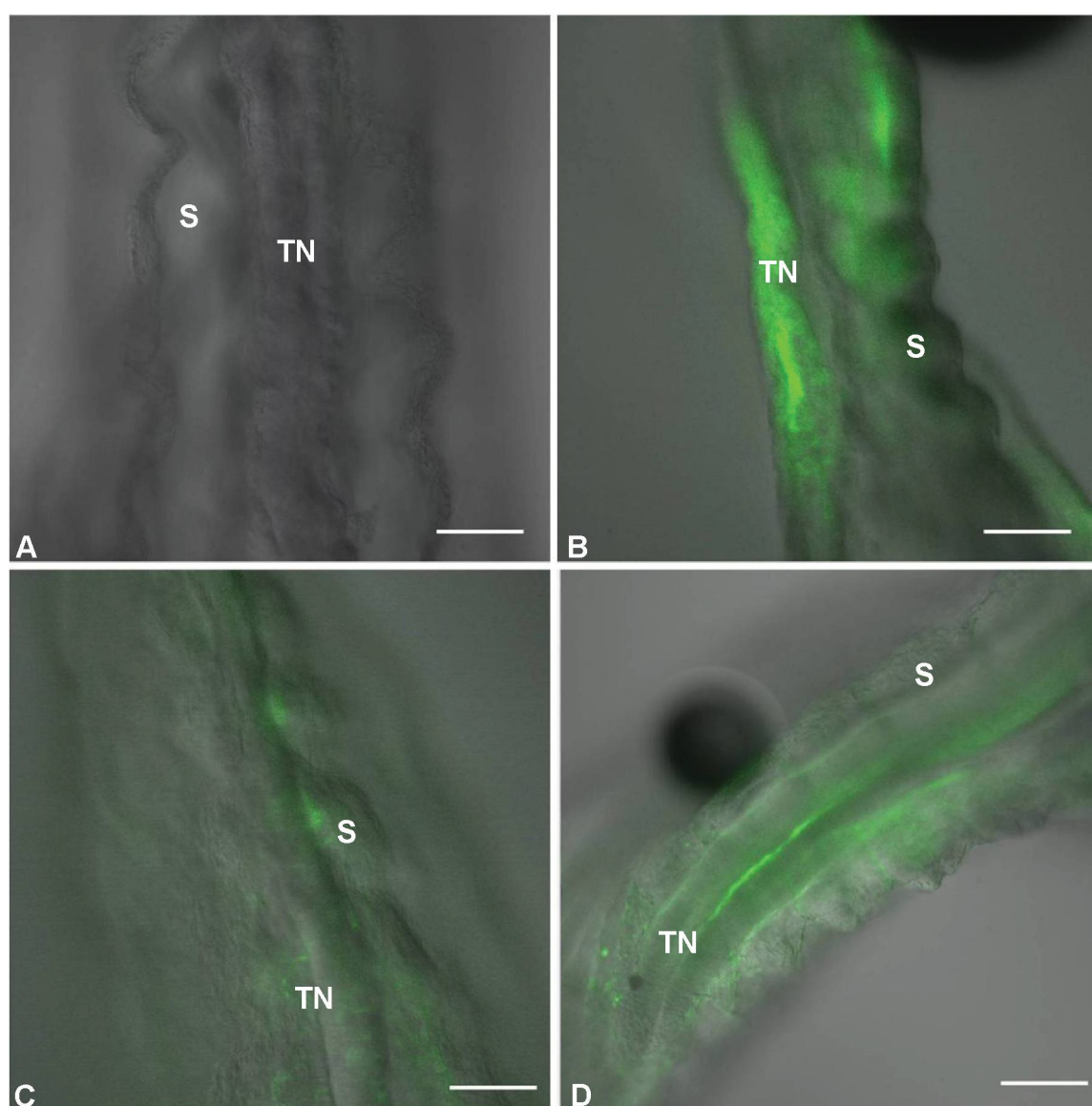


($p < 0,05$). Média e erro padrão. Controle $n = 64$. Veículo $n = 93$. Cd 0,5 $\mu\text{g/ml}$ $n = 38$. Cd 5 $\mu\text{g/ml}$ $n = 41$. Cd 25 $\mu\text{g/ml}$ $n = 27$. PFOA 5 ng/ml $n = 33$. PFOA 50 ng/ml $n = 33$. PFOA 250 ng/ml $n = 27$. Cd 0,5 $\mu\text{g/ml}$ + PFOA 5 ng/ml $n = 31$. FONTE: A autora (2017).

4.3 BIODISPONIBILIDADE DO CÁDMIO

Utilizando o marcador fluorescente Leadmium™ Green AM dye foi possível verificar que o metal está atingindo o embrião devido a ausência de fluorescência no embrião controle (Figura 10 A) e sua presença nas amostras contaminadas com o Cd (Figura 10 B-D). Além disso, pode-se observar que há uma concentração de fluorescência principalmente na região do tubo neural e somitos (Figura 10 C e D).

FIGURA 10 - MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL (DIC) E FLUORESCÊNCIA



A: Embrião controle, sem Cd. B-D: Embriões marcados com Leadmium™ Green AM dye (excitação 490nm, emissão 520nm). B e C: Embrião grupo exposto I (Cd 0,5 µg/ml). D: Embrião grupo exposto II (Cd 5 µg/ml). Barra = 100µm. FONTE: A autora (2017).

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica foi realizada de acordo com as características descritas por Hamburger e Hamilton (1951), observando-se principalmente os aspectos morfológicos das vesículas encefálicas, membros, vesículas ópticas e auditivas, tubo neural e curvatura do corpo.

Da mesma forma que a taxa de mortalidade, a ocorrência de malformações não variou de maneira estatisticamente significativa entre os grupos controle, mostrando que a manipulação dos ovos também não interfere no surgimento de alterações morfológicas. A taxa de malformações foi de 12% no controle fechado e 24% no veículo.

A ocorrência de alterações morfológicas variou entre os grupos expostos, sendo estatisticamente significativa nos grupos expostos a maior concentração de Cd, ao PFOA nas três concentrações e nos embriões expostos à mistura, quando comparados com o veículo. Nos grupos expostos ao Cd a porcentagem de embriões alterados morfolologicamente foi de 40,3% no grupo exposto I (Cd 0,5 µg/ml), 47,2% no grupo exposto II (Cd 5 µg/ml) e 64,1% no grupo exposto III (Cd 25 µg/ml). A taxa de malformações nos grupos expostos com o PFOA foi de 51,25% no grupo exposto IV (PFOA 5 ng/ml), 52% no grupo exposto V (PFOA 50 ng/ml) e 67,5% no grupo exposto VI (PFOA 250 ng/ml). No grupo exposto à mistura a ocorrência de malformações foi de 68,1%. Não houve diferença estatística entre os grupos expostos, como observada na figura 11.

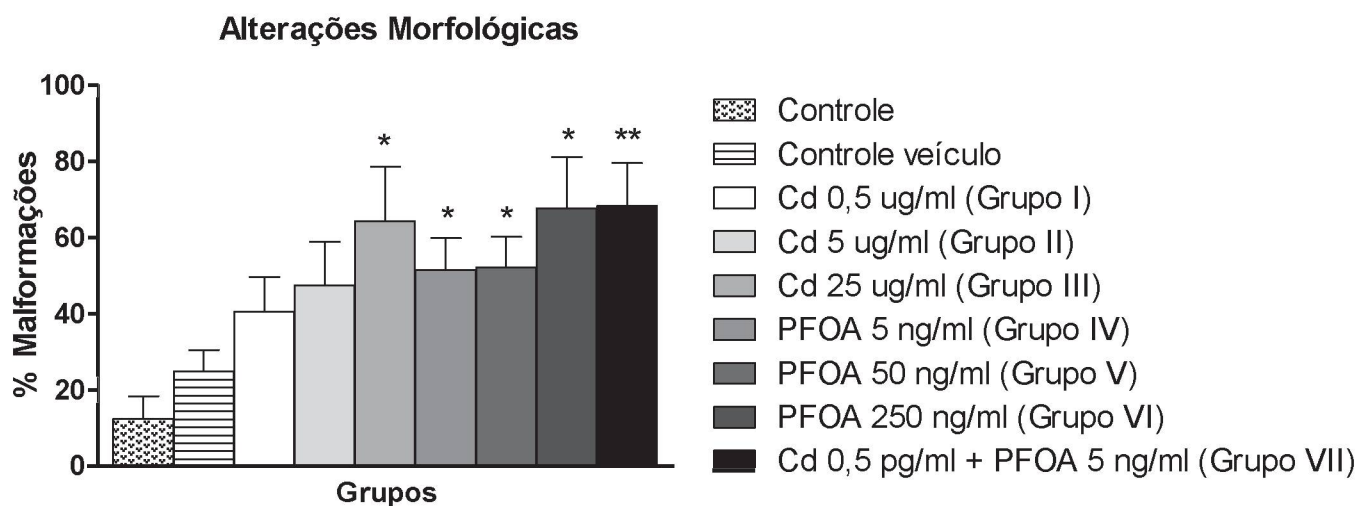
As alterações morfológicas encontradas foram malformações na curvatura do corpo, região encefálica, do tronco e caudal, falha no fechamento do tubo neural na região entre o broto das asas e das pernas e defeito na parede do corpo (Tabela 4). Dentre as malformações na região encefálica estão as alterações no formato e tamanho das vesículas encefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), bem como a ausência dessas estruturas. Já na região caudal foram encurtamento e curvatura anormal. Houve também a ocorrência de embriões com intensas malformações por todo o corpo, nos quais não foi possível identificar a maioria das estruturas ou determinar o estágio embrionário.

As malformações observadas nos embriões frente à exposição aos contaminantes foram as mesmas em todos os grupos expostos (Figura 12-18), com variações na frequência (Tabela 4). Dentre as malformações encontradas que tiveram aumento significativo na incidência nos grupos expostos ao PFOA e a mistura, em relação ao controle, podemos citar as alterações na curvatura, região encefálica e caudal e tubo neural aberto.

Uma análise adicional foi feita considerando as alterações encefálicas e de tubo neural aberto como malformações de sistema nervoso. Dessa forma, foi observado aumento significativo na incidência desse tipo de malformação em todos os grupos expostos (Tabela 5).

A análise morfológica do coração, através da montagem total, revelou alterações visíveis em apenas 1 dos 377 indivíduos analisados, no grupo exposto ao Cd 5 µg/ml. Porém, em muitos embriões não foi possível visualizar e analisar o coração devido à posição do embrião como consequência de outras malformações.

FIGURA 11 - INCIDÊNCIA DE MALFORMAÇÕES POR GRUPO EXPERIMENTAL



*Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,05$). **Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,01$). Média e erro padrão. Controle $n = 64$. Veículo $n = 93$. Cd 0,5 µg/ml $n = 38$. Cd 5 µg/ml $n = 32$. Cd 25 µg/ml $n = 27$. PFOA 5 ng/ml $n = 33$. PFOA 50 ng/ml $n = 33$. PFOA 250 ng/ml $n = 26$. Cd 5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 31$. FONTE: A autora (2017).

TABELA 4 - INCIDÊNCIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS POR GRUPO EXPERIMENTAL E POR TIPO DE MALFORMAÇÃO

Grupo	Embriões analisados (n)	Taxa de Mortalidade	Ocorrência de Malformações	Tipo de malformação					
				Curvatura	Tubo neural aberto	Região encefálica	Região caudal	Defeito na parede do corpo	Intensas malformações
CF	64	23%	12%	0%	2,6%	0%	0%	1%	2%
CV	93	26%	24%	9%	2%	9%	10%	7%	5%
Cd 0,5 µg/ml	38	27,2%	40,3%	22,9%	7,2%	27%	22,9%	14,5%	14,3%
Cd 5 µg/ml	32	26,2%	47,2%	27%	20,8%	25%	25%	23,9%	24,2%
Cd 25 µg/ml	27	53,6%*	64,1%*	25,4%	25%	31,6%	14,3%	14,7%	22,5%
PFOA 5 ng/ml	33	22,9%	51,2%*	30,2%	23,9%	36,1%	27,4%	13,5%	17,6%
PFOA 50 ng/ml	33	30,3%	52%*	34,3%	32,9%	18,7%	44,7%*	6,4%	11,3%
PFOA 250 ng/ml	26	43,5%	67,5%*	45,8%*	54,5%**	48,9%*	19,1%	39,2%*	27,5%
Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml	31	44,1%	68,1%**	53%*	40,2%**	49,7%*	39,7%*	17%	25%

CF = controle fechado, CV = controle veículo. *Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,05$). **Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,01$). FONTE: A autora (2017).

TABELA 5 - INCIDÊNCIA DE MALFORMAÇÕES DE SISTEMA NERVOSO, POR GRUPO EXPERIMENTAL

Grupo	Malformações de sistema nervoso
CF	6%
CV	16%
Cd 0,5 µg/ml	34%*
Cd 5 µg/ml	34%*
Cd 25 µg/ml	40%**
PFOA 5 ng/ml	39%*
PFOA 50 ng/ml	42%*
PFOA 250 ng/ml	50%**
Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml	58%**

Teste Exato de Fisher. *Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,05$). **Resultado significativamente diferente do veículo ($p < 0,01$). FONTE: A autora (2017).

Os estádios embrionários encontrados foram os 16, 17, 18 e 19, correspondentes ao tempo de incubação entre 51 e 72 horas, segundo a descrição de Hamburger e Hamilton (1951). A Tabela 6 mostra a porcentagem de embriões em cada um dos estádios embrionários encontrados. Considerando as características morfológicas não foi observado atraso no desenvolvimento dos embriões expostos ao Cd e PFOA, em relação ao controle.

TABELA 6 - ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS OBTIDOS POR GRUPO EXPERIMENTAL

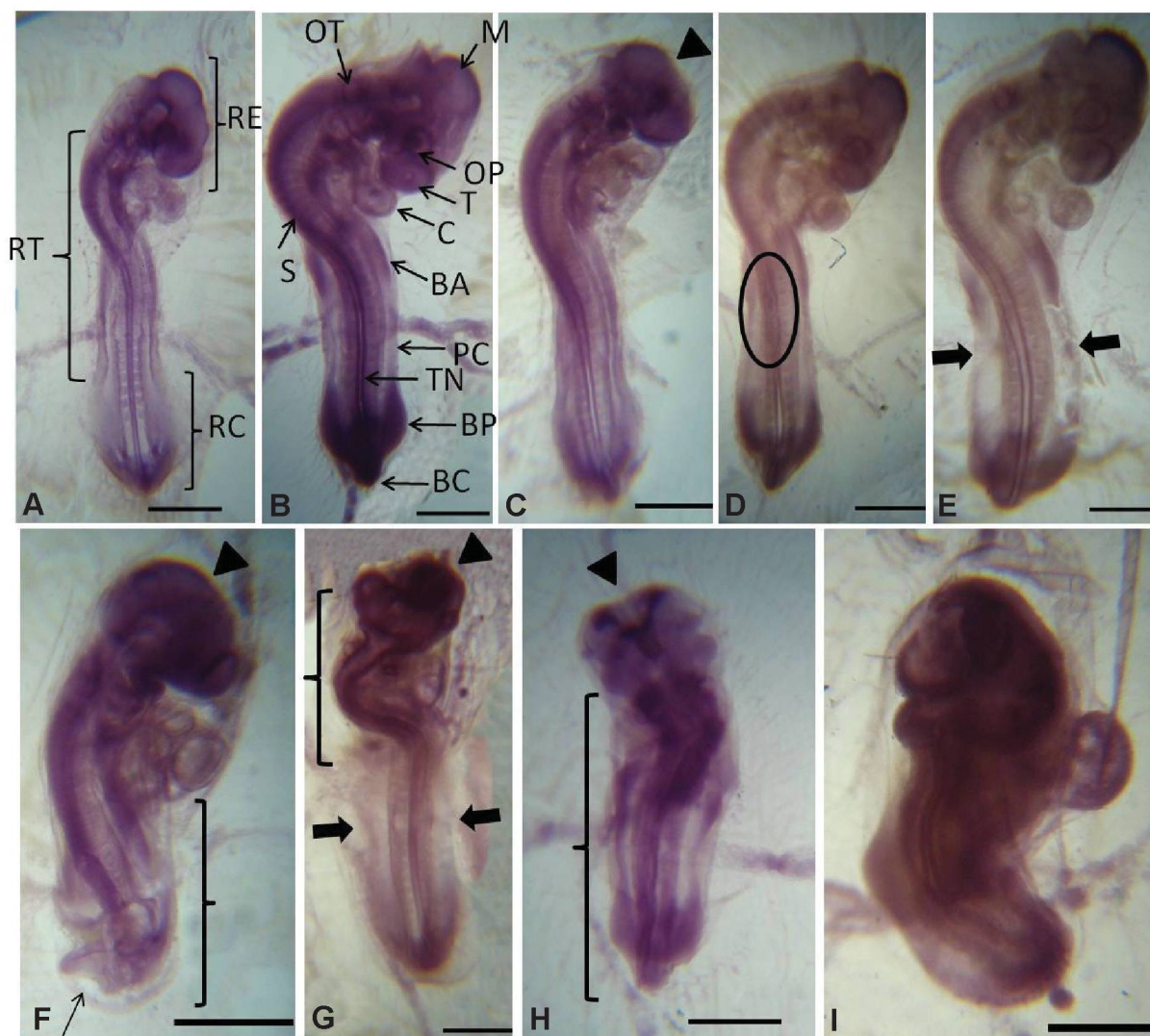
Grupo	Estádio			
	16	17	18	19
CF	13%	50%	32%	5%
CF	21%	51%	22%	6%
Cd 0,5 µg/ml	14%	48%	31%	7%
Cd 5 µg/ml	27%	41%	23%	9%
Cd 25 µg/ml	21%	37%	32%	10%
PFOA 5 ng/ml	23%	50%	23%	4%
PFOA 50 ng/ml	20%	60%	17%	3%
PFOA 250 ng/ml	25%	56%	13%	6%
Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml	21%	37%	32%	10%

Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). FONTE: A autora (2017).

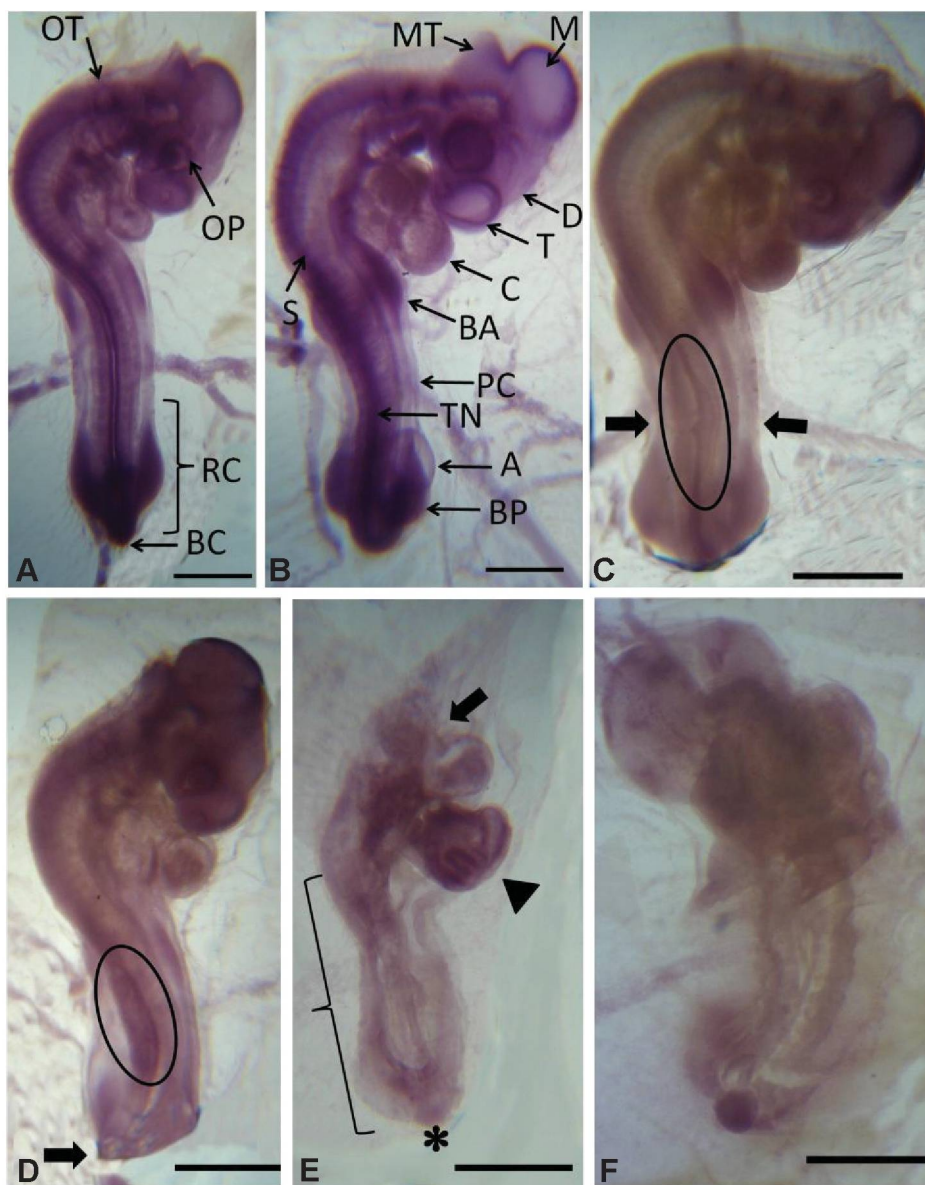
Como pode ser observado na Tabela 5, houve uma grande diferença no número de embriões nos grupos controle fechado, veículo e expostos. Essa diferença ocorreu porque os experimentos foram realizados separadamente. Primeiro realizou-se a exposição ao Cd, posteriormente ao PFOA e por último à mistura. Foram utilizados embriões sem injeção

somente nos experimentos de exposição ao Cd e ao PFOA. Como foi constatada a ausência de diferença significativa entre os grupos controle nos parâmetros analisados, o grupo controle fechado foi excluído dos experimentos com exposição à mistura, reduzindo o número de ovos utilizados.

FIGURA 12 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO I (Cd 0,5 µg/ml)

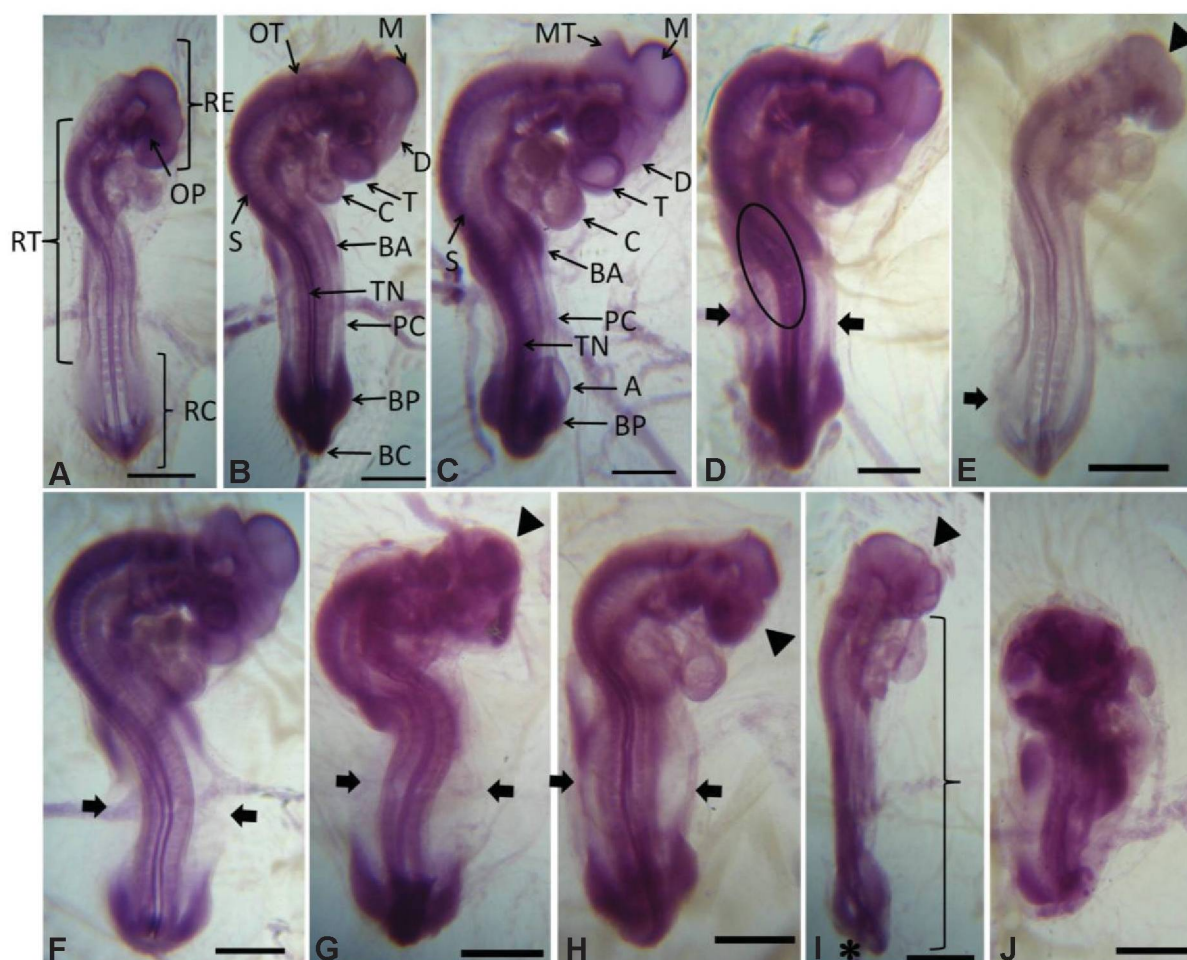


A e B: Embriões controle, estágio 16 e 17, respectivamente. C-I: Embriões grupo exposto I. C, F, G e H: Malformações na região encefálica (cabeça de seta). D: Falha no fechamento do tubo neural (área circulada). E e G: Falha no fechamento da parede do corpo (setas). F: Região caudal malformada (seta). F-H: Alterações na curvatura do corpo (}). I: Embrião com intensas malformações por todo o corpo. RE: região encefálica, RT: região do tronco, RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, OP: vesícula óptica, T: telencéfalo, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 13 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO II (Cd 5 μ g/ml)

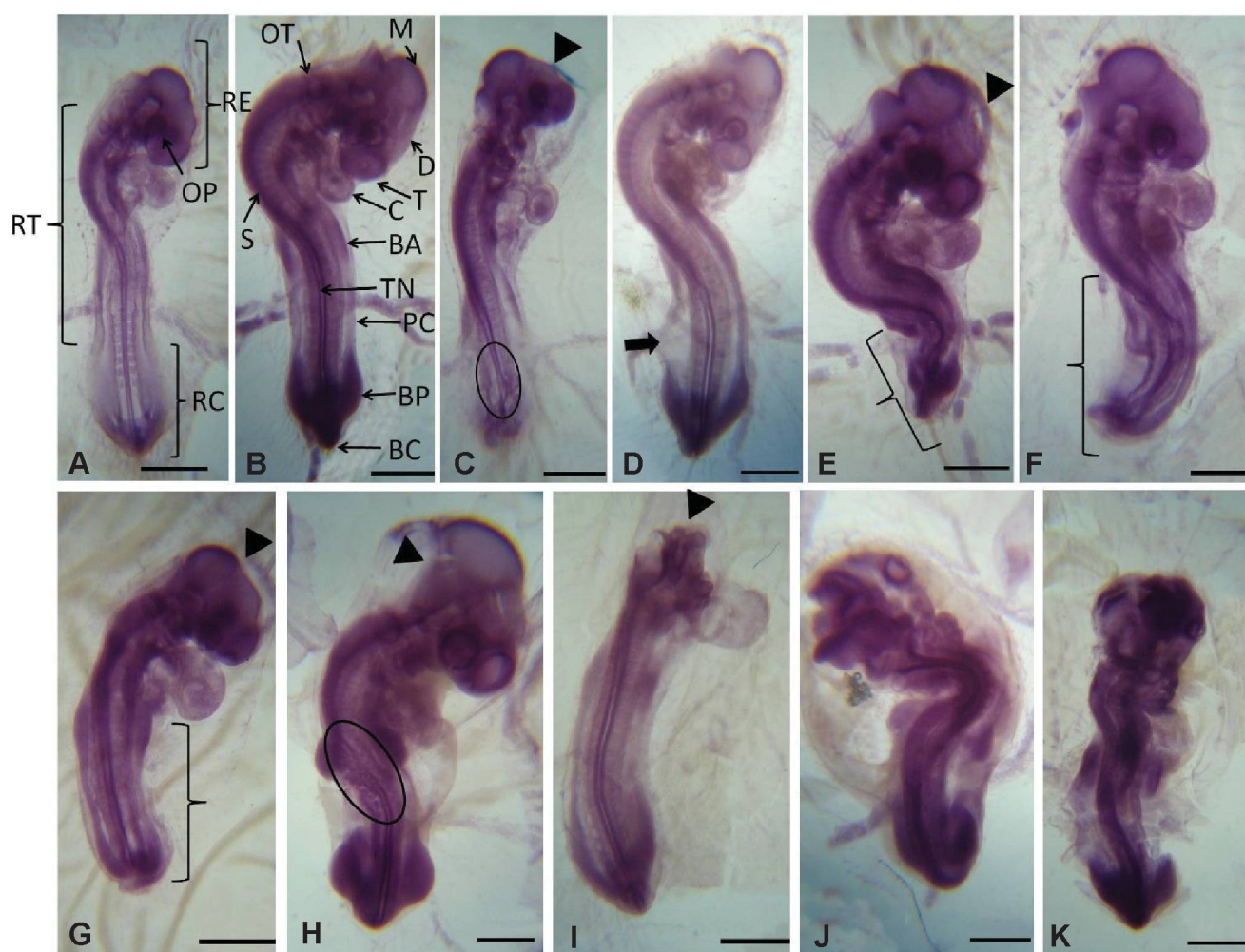
A e B: Embriões controle, estágio 17 e 18, respectivamente. C-F: Embriões grupo exposto II. C e D: Falha no fechamento do tubo neural (área circulada) D: Região caudal malformada (seta). E: Malformações nas regiões encefálica (seta), caudal (*) e do tronco (}) e no coração (cabeça de seta). F: Embrião com intensas malformações por todo o corpo. RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, D: diencéfalo, MT: metencéfalo, T: telencéfalo, OP: vesícula ótica, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, A: alantóide, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 14 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO III (Cd 25 µg/ml)



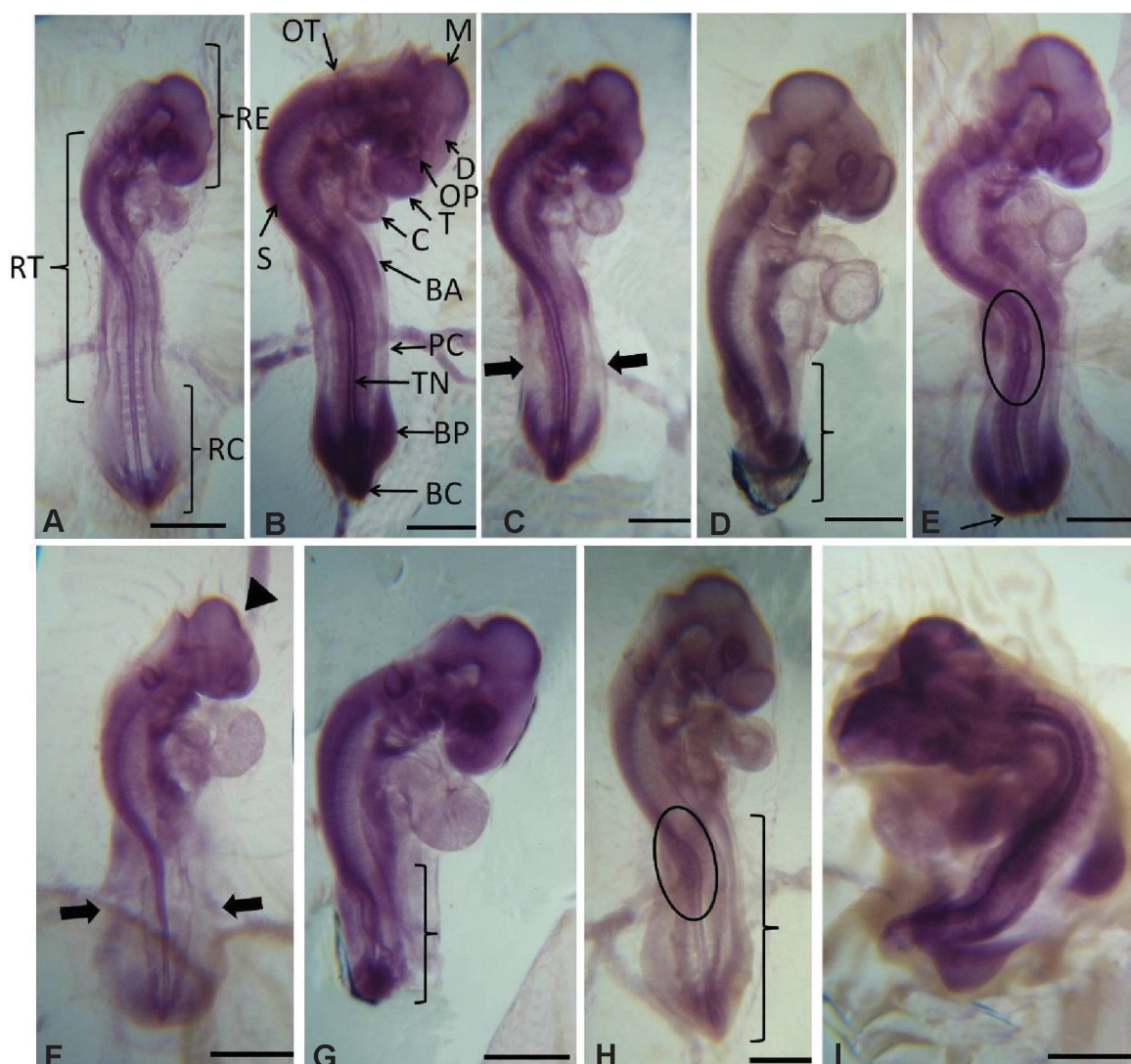
A-C: Embriões controle, estágio 16, 17 e 18, respectivamente. D-J: Embriões grupo exposto III. D: Falha no fechamento do tubo neural (área circulada). D-H: Parede do corpo aberta (setas). E, G-I: Malformações na região encefálica (cabeça de seta). I: Malformações na região caudal (*), do tronco e curvatura do corpo (}). J: Embrião com extensas malformações por todo o corpo. RE: região encefálica, RT: região do tronco, RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, D: diencéfalo, MT: metencéfalo, T: telencéfalo, OP: vesícula ótica, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, A: alantóide, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 15 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO IV (PFOA 5 ng/ml)



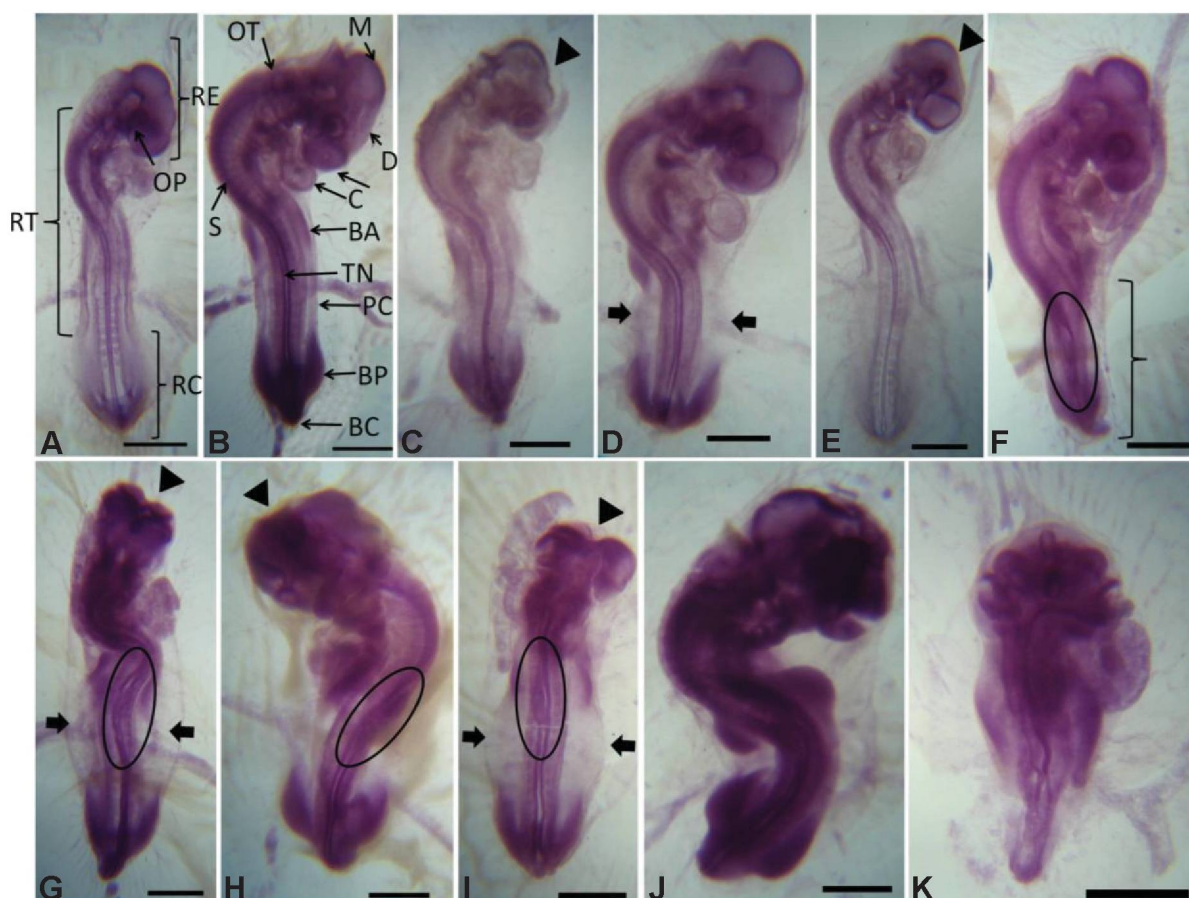
A e B: Embriões controle, estádios 16 e 17, respectivamente. C-K: Embriões grupo exposto IV. C, E, G-I: Malformações na região encefálica (cabeça de seta). D: Parede do corpo aberta (seta). E-G: Malformações na região do tronco, caudal e curvatura do corpo (}). C e H: Malformações no tubo neural (área circulada). J e K: Embriões com intensas malformações por todo o corpo. RE: região encefálica, RT: região do tronco, RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, D: diencéfalo, T: telencéfalo, OP: vesícula ótica, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 16 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO V (PFOA 50 ng/ml)



A e B: Embriões controle, estádios 16 e 17, respectivamente. C-I: Embriões grupo exposto V. C e F: Parede do corpo aberta (setas). D, G e H: Malformações na região do tronco, caudal e curvatura (}). E e H: Falha no fechamento do tubo neural (área circulada). F: Malformação na região encefálica (cabeça de seta). I: Embrião com intensas malformações por todo o corpo. RE: região encefálica, RT: região do tronco, RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, D: diencéfalo, T: telencéfalo, OP: vesícula ótica, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 17 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO VI (PFOA 250 ng/ml)



A e B: Embriões controle, estádios 16 e 17, respectivamente. C-K: Embriões grupo exposto V. C, E, G-I: Malformação na região encefálica (cabeça de seta). D, G e I: Parede do corpo aberta (setas). F-I: Falha no fechamento do tubo neural (área circulada). F: Malformações na região do tronco e caudal (}). G-I: Curvatura anormal. J e K: Embriões com intensas malformações por todo o corpo. RE: região encefálica, RT: região do tronco, RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, D: diencéfalo, T: telencéfalo, OP: vesícula ótica, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 18 - EMBRIÕES CONTROLE E GRUPO EXPOSTO VII (Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml)



A e B: Embriões controle, estádios 16 e 17, respectivamente. C-I: Embriões expostos à mistura. C e F: Falha no fechamento do tubo neural (área circulada). C, D e F: Falha no fechamento da parede do corpo (setas). C, D, E e G: Malformações na região encefálica (ponta de seta). G: Curvatura anormal (}). H e I: Embriões com intensas malformações por todo o corpo. RE: região encefálica, RT: região do tronco, RC: região caudal, OT: vesícula ótica, M: mesencéfalo, T: telencéfalo, OP: vesícula ótica, C: coração, BA: broto da asa, PC: parede do corpo, BP: broto da perna, BC: broto da cauda, S: somito, TN: tubo neural. Barra = 1mm. FONTE: A autora (2017)

4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

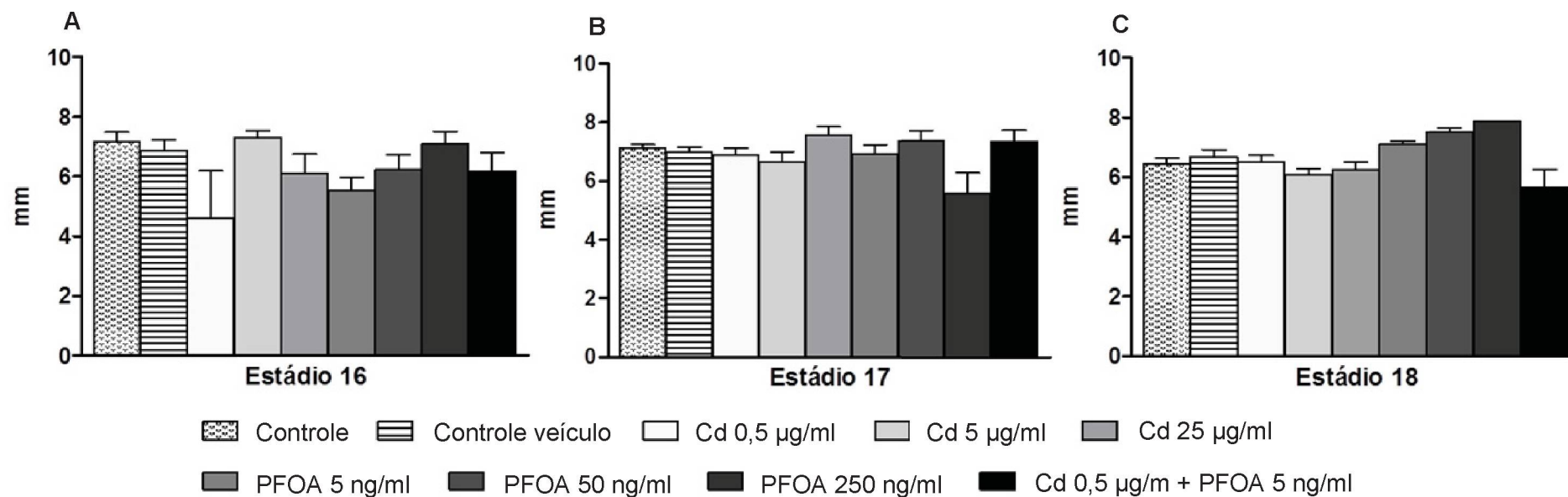
A análise morfométrica foi realizada avaliando-se os parâmetros de: comprimento do corpo, distância anteroposterior da base do mesencéfalo, altura no mesencéfalo, distância anteroposterior entre o prosencéfalo e o metencéfalo, índice de orientação da cabeça e área total do embrião. As comparações entre as medidas foram realizadas entre embriões no mesmo estágio de desenvolvimento, uma vez que cada estágio apresenta uma característica morfológica específica.

Somente os dados obtidos dos embriões no estágio 17 possibilitaram a realização da análise estatística de todos os grupos experimentais. Nos estágios 16 e 18 somente em alguns grupos foi obtido o "n" amostral ($n \geq 5$) necessário para analisar estatisticamente os dados (Tabela 5). Os resultados obtidos com os embriões no estágio 19 não foram demonstrados, pois a maioria dos grupos apresentou no máximo 3 embriões nesse estágio. Além disso, muitos embriões apresentaram malformações, severas ou não, que impossibilitaram a delimitação precisa das estruturas para a realização da análise morfométrica e determinação do estágio embrionário para a realização das comparações. Dos 220 embriões expostos obtidos, 65 não puderam ser analisados (30%).

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e controle veículo, mostrando que a manipulação dos ovos não interfere nos parâmetros morfométricos analisados.

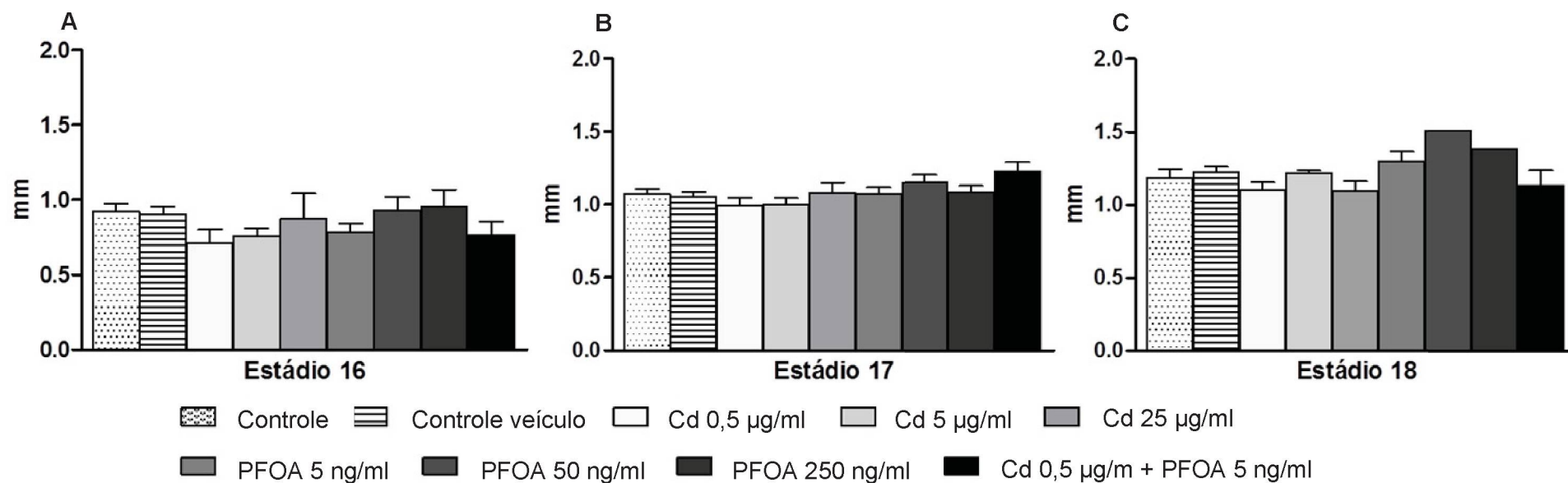
Houve variação nos parâmetros morfométricos analisados, porém as alterações não foram estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (Figuras 19-24).

FIGURA 19 - COMPRIMENTO DO CORPO DO EMBRIÃO (MM), POR ESTÁDIO EMBRIONÁRIO, POR GRUPO



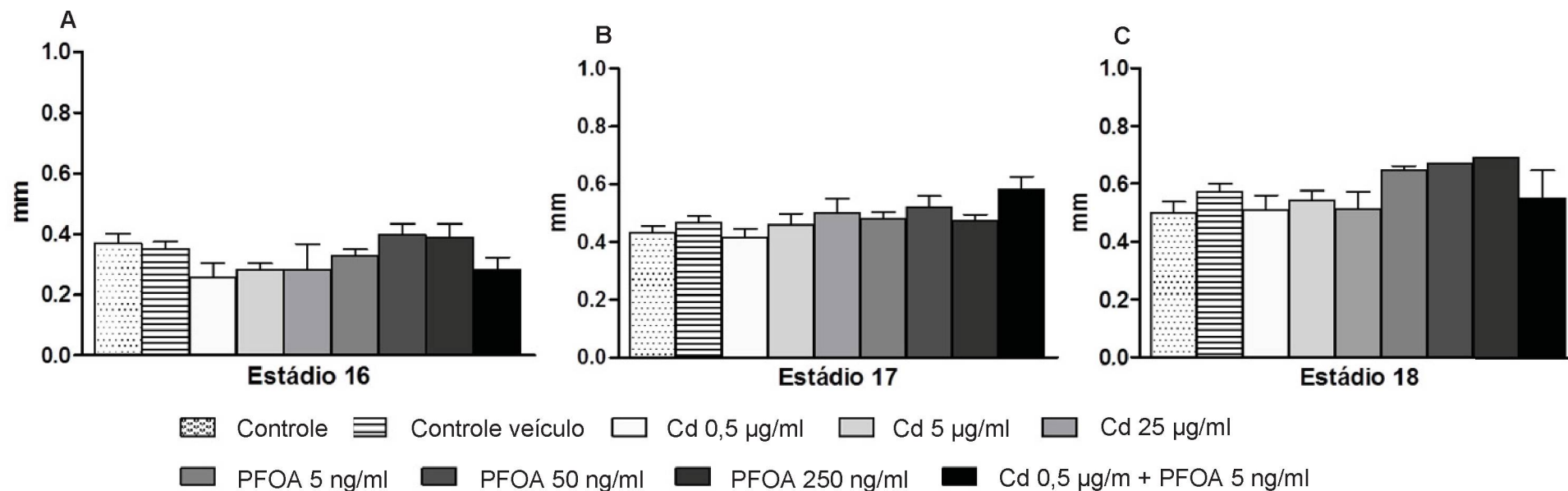
($p < 0,05$). Média e erro padrão. A: Estádio 16. Controle $n = 16$. Veículo $n = 8$. Cd 0,5 µg/ml $n = 3$. Cd 5 µg/ml $n = 4$. Cd 25 µg/ml $n = 2$. PFOA 5 ng/ml $n = 6$. PFOA 50 ng/ml $n = 5$. PFOA 250 ng/ml $n = 4$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. B: Estádio 17. Controle $n = 20$. Veículo $n = 22$. Cd 0,5 µg/ml $n = 12$. Cd 5 µg/ml $n = 10$. Cd 25 µg/ml $n = 10$. PFOA 5 ng/ml $n = 14$. PFOA 50 ng/ml $n = 17$. PFOA 250 ng/ml $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 8$. C: Estádio 18. Controle $n = 12$. Veículo $n = 15$. Cd 0,5 µg/ml $n = 8$. Cd 5 µg/ml $n = 3$. Cd 25 µg/ml $n = 6$. PFOA 5 ng/ml $n = 5$. PFOA 50 ng/ml $n = 2$. PFOA 250 ng/ml $n = 1$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 20 - DISTÂNCIA ANTEROPOSTERIOR DA BASE DO MESENCÉFALO (MM), POR ESTÁDIO EMBRIONÁRIO, POR GRUPO



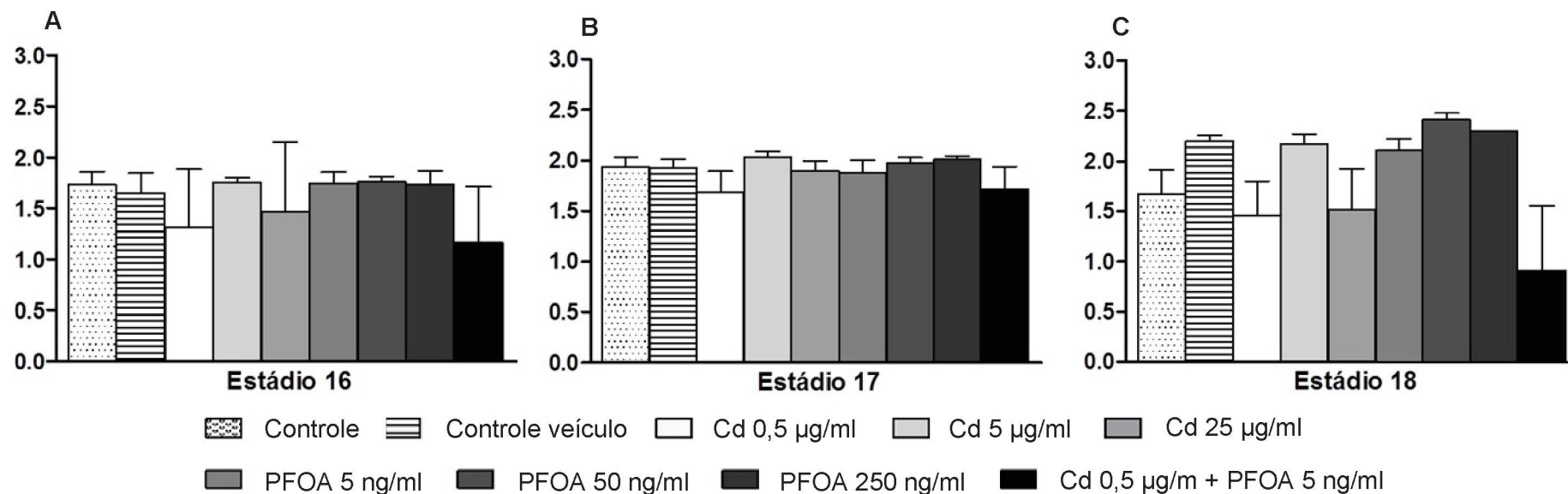
($p < 0,05$). Média e erro padrão. A: Estádio 16. Controle $n = 13$. Veículo $n = 8$. Cd 0,5 µg/ml $n = 3$. Cd 5 µg/ml $n = 5$. Cd 25 µg/ml $n = 3$. PFOA 5 ng/ml $n = 6$. PFOA 50 ng/ml $n = 5$. PFOA 250 ng/ml $n = 4$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 4$. B: Estádio 17. Controle $n = 21$. Veículo $n = 23$. Cd 0,5 µg/ml $n = 13$. Cd 5 µg/ml $n = 11$. Cd 25 µg/ml $n = 10$. PFOA 5 ng/ml $n = 14$. PFOA 50 ng/ml $n = 17$. PFOA 250 ng/ml $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 9$. C: Estádio 18. Controle $n = 11$. Veículo $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml $n = 9$. Cd 5 µg/ml $n = 3$. Cd 25 µg/ml $n = 6$. PFOA 5 ng/ml $n = 5$. PFOA 50 ng/ml $n = 2$. PFOA 250 ng/ml $n = 1$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 21 - ALTURA DO MESENCÉFALO (MM), POR ESTÁDIO EMBRIONÁRIO, POR GRUPO



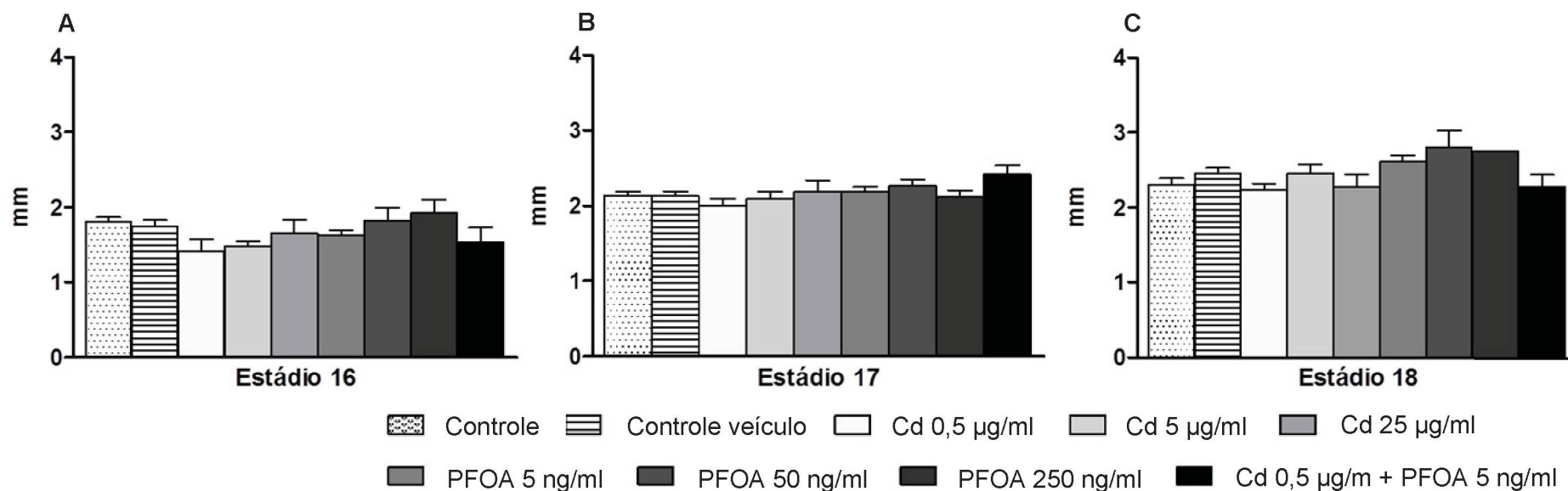
($p < 0,05$). Média e erro padrão. A: Estádio 16. Controle $n = 13$. Veículo $n = 8$. Cd 0,5 µg/ml $n = 3$. Cd 5 µg/ml $n = 5$. Cd 25 µg/ml $n = 3$. PFOA 5 ng/ml $n = 6$. PFOA 50 ng/ml $n = 5$. PFOA 250 ng/ml $n = 4$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 4$. B: Estádio 17. Controle $n = 20$. Veículo $n = 23$. Cd 0,5 µg/ml $n = 13$. Cd 5 µg/ml $n = 11$. Cd 25 µg/ml $n = 10$. PFOA 5 ng/ml $n = 14$. PFOA 50 ng/ml $n = 17$. PFOA 250 ng/ml $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 9$. C: Estádio 18. Controle $n = 11$. Veículo $n = 11$. Cd 0,5 µg/ml $n = 9$. Cd 5 µg/ml $n = 3$. Cd 25 µg/ml $n = 6$. PFOA 5 ng/ml $n = 5$. PFOA 50 ng/ml $n = 2$. PFOA 250 ng/ml $n = 1$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 22 - ÍNDICE DE ORIENTAÇÃO DA CABEÇA, POR ESTÁDIO EMBRIONÁRIO, POR GRUPO

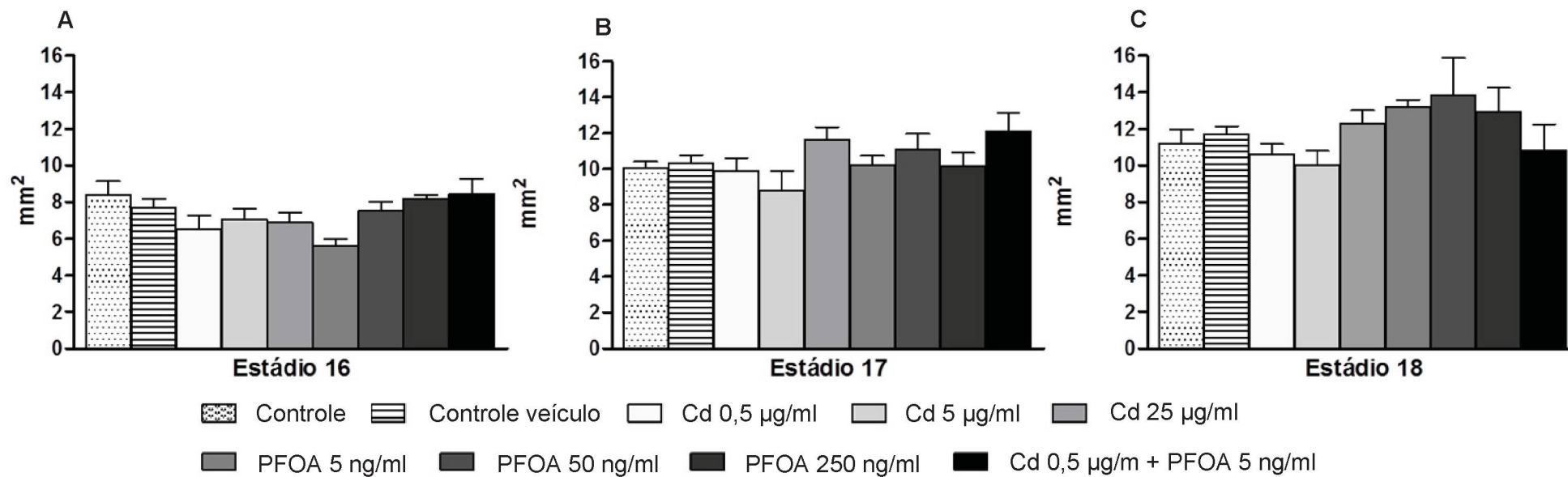


($p < 0,05$). Média e erro padrão. A: Estádio 16. Controle $n = 13$. Veículo $n = 8$. Cd 0,5 µg/ml $n = 3$. Cd 5 µg/ml $n = 4$. Cd 25 µg/ml $n = 3$. PFOA 5 ng/ml $n = 6$. PFOA 50 ng/ml $n = 5$. PFOA 250 ng/ml $n = 4$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. B: Estádio 17. Controle $n = 21$. Veículo $n = 22$. Cd 0,5 µg/ml $n = 12$. Cd 5 µg/ml $n = 9$. Cd 25 µg/ml $n = 10$. PFOA 5 ng/ml $n = 14$. PFOA 50 ng/ml $n = 17$. PFOA 250 ng/ml $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 8$. C: Estádio 18. Controle $n = 12$. Veículo $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml $n = 8$. Cd 5 µg/ml $n = 3$. Cd 25 µg/ml $n = 6$. PFOA 5 ng/ml $n = 5$. PFOA 50 ng/ml $n = 4$. PFOA 250 ng/ml $n = 3$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 23 - DISTÂNCIA ANTEROPOSTERIOR ENTRE O PROSENCÉFALO E METENCÁFALO (MM), POR ESTÁDIO EMBRIONÁRIO, POR GRUPO



($p < 0,05$). Média e erro padrão. A: Estádio 16. Controle $n = 13$. Veículo $n = 8$. Cd 0,5 µg/ml $n = 3$. Cd 5 µg/ml $n = 5$. Cd 25 µg/ml $n = 3$. PFOA 5 ng/ml $n = 6$. PFOA 50 ng/ml $n = 5$. PFOA 250 ng/ml $n = 4$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 4$. B: Estádio 17. Controle $n = 21$. Veículo $n = 23$. Cd 0,5 µg/ml $n = 13$. Cd 5 µg/ml $n = 10$. Cd 25 µg/ml $n = 10$. PFOA 5 ng/ml $n = 14$. PFOA 50 ng/ml $n = 17$. PFOA 250 ng/ml $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 9$. C: Estádio 18. Controle $n = 11$. Veículo $n = 12$. Cd 0,5 µg/ml $n = 9$. Cd 5 µg/ml $n = 3$. Cd 25 µg/ml $n = 6$. PFOA 5 ng/ml $n = 5$. PFOA 50 ng/ml $n = 2$. PFOA 250 ng/ml $n = 1$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 24 - ÁREA TOTAL DO EMBRIÃO (MM²), POR ESTÁDIO EMBRIONÁRIO, POR GRUPO

($p < 0,05$). Média e erro padrão. A: Estádio 16. Controle $n = 8$. Veículo $n = 13$. Cd 0,5 µg/ml $n = 3$. Cd 5 µg/ml $n = 3$. Cd 25 µg/ml $n = 4$. PFOA 5 ng/ml $n = 6$. PFOA 50 ng/ml $n = 7$. PFOA 250 ng/ml $n = 2$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 2$. B: Estádio 17. Controle $n = 23$. Veículo $n = 22$. Cd 0,5 µg/ml $n = 12$. Cd 5 µg/ml $n = 6$. Cd 25 µg/ml $n = 7$. PFOA 5 ng/ml $n = 14$. PFOA 50 ng/ml $n = 10$. PFOA 250 ng/ml $n = 10$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 9$. C: Estádio 18. Controle $n = 14$. Veículo $n = 13$. Cd 0,5 µg/ml $n = 9$. Cd 5 µg/ml $n = 6$. Cd 25 µg/ml $n = 7$. PFOA 5 ng/ml $n = 4$. PFOA 50 ng/ml $n = 4$. PFOA 250 ng/ml $n = 3$. Cd 0,5 µg/ml + PFOA 5 ng/ml $n = 3$. FONTE: A autora (2017).

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que ambos os xenobióticos testados são potencialmente tóxicos para o desenvolvimento normal dos embriões de *Gallus gallus*. O desenvolvimento embrionário e fetal apresenta períodos críticos em que o indivíduo é mais sensível à ação de fatores externos potencialmente teratogênicos, já que nesses períodos há altas taxas de proliferação e diferenciação celulares que, quando perturbadas, podem gerar anomalias e até a morte do embrião. O período de desenvolvimento em que há a interferência de um agente teratogênico pode determinar qual região ou órgão do embrião estará mais propenso ao aparecimento de anomalias (SCHÜLER-FACCINI, 2011). No caso do presente estudo o tecido nervoso parece ser um tecido alvo importante para os dois contaminantes. Em humanos, a ação de agentes externos durante o período entre a fertilização e a terceira semana de gestação pode levar à morte do embrião (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2013). No período da terceira a oitava semana ocorre a formação de órgãos e há alta susceptibilidade ao desenvolvimento anormal de diversas estruturas, como sistema nervoso central, coração e membros (SADLER, 2016). O modelo utilizado nesse trabalho abrange parcialmente esses períodos, correspondendo aproximadamente até a quinta semana de desenvolvimento humano (HILL, 2017), destacando a grande relevância dos dados apresentados, uma vez que as concentrações testadas são semelhantes aos valores encontrados no cordão umbilical humano, para algumas concentrações de ambos contaminantes.

Os embriões utilizados nesse estudo passaram pelos três primeiros períodos críticos descritos por Christensen (2001). Durante o segundo período crítico, os ovos foram transportados até o laboratório e injetados com as concentrações dos contaminantes. Apesar dos embriões terem sido expostos por dois dos primeiros períodos críticos do desenvolvimento, a taxa de mortalidade dos expostos foi significativamente maior que a dos controles somente na maior concentração de Cd (25 µg/ml). Entretanto, Yamamoto e colaboradores (2012) verificaram um aumento significativo, quando comparado ao controle, de 30% para 41% na taxa de mortalidade de embriões de *G. gallus*, expostos à concentração de Cd 5 µg/ml, após 3 dias de incubação. Ainda que a concentração de Cd de duas das soluções utilizadas para a exposição dos embriões ao contaminante tenha sido a mesma testada nesse trabalho, possivelmente a dose (g de Cd por g de ovo) empregada tenha sido superior, visto que o volume de injeção foi 10 vezes maior. Porém, não é possível precisar a dose utilizada, pois o peso dos ovos não foi mencionado no trabalho. Além disso, a análise

estatística empregada por Yamamoto e colaboradores (2012) foi diferente da aplicada nesse trabalho. Thompson e colaboradores (2010) submeteram embriões de *Gallus gallus* com 60 horas de incubação a 50 µl de solução de Cd 100 ng/ml e 24 horas depois a taxa de mortalidade encontrada foi significativamente maior que no controle. Porém há trabalhos que mostram ausência de aumento na mortalidade frente a exposição ao Cd (THOMPSON; BANNIGAN, 2001; THOMPSON; BANNIGAN, 2007; CULLINANE; BANNIGAN; THOMPSON, 2009). A maior concentração de Cd utilizada no presente trabalho (25 µg/ml) foi maior que utilizada por Thompson e colaboradores (2010) e mais letal aos embriões também por ter sido administrada mais precocemente, dessa forma interferindo na retomada do desenvolvimento na transição entre o segundo e terceiro períodos críticos. Portanto, apesar de haver similaridades em termos de abordagens com os trabalhos citados acima, os dados apresentados neste trabalho se destacam dos demais pela complexidade e cuidado tanto com o desenho experimental como com as análises morfométricas.

Não há dados na literatura a respeito da taxa de mortalidade de embriões com 3 dias de incubação após exposição ao PFOA, visto que os estudos para este composto referem-se a estágios mais avançados do desenvolvimento. Em embriões da galinha com 19 dias de incubação, expostos previamente à incubação, a taxa de mortalidade aumentou de 26,7%, nos injetados com o veículo, para 46,9% nos expostos à dose de 2 µg de PFOA/g de ovo, enquanto nos nascidos não houve diferença na mortalidade entre esses grupos (JIANG et al., 2012). Nesse caso, os embriões foram expostos a uma dose maior de PFOA, por um período de tempo mais longo que o testado no presente trabalho. Além disso, não é possível garantir que os embriões vivos ao terceiro dia suportariam as extensas alterações morfológicas observadas e permaneceriam vivos por mais tempo.

Neste trabalho não foi utilizado protocolo anestésico, visto que a analgesia por hipotermia (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015) antes da abertura do ovo alteraria a frequência cardíaca, comprometendo a análise. Porém, o estágio de desenvolvimento em que os embriões foram coletados (3 dias) não requer a utilização de anestesia, já que o embrião de galinha apresenta capacidade de nocicepção somente a partir do 7º dia de incubação (ROSENBRUCH, 1997). Depois desse período, experimentos utilizando embriões de galinha devem ser realizados com anestesia e eutanásia apropriadas, proporcionando mínima dor e estresse ao animal (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015).

Os batimentos cardíacos do embrião de *G. gallus* se iniciam aproximadamente no estágio HH10 (33-38 horas de incubação) e a circulação está bem estabelecida no estágio HH16 (51-56 horas de incubação) (BELLAIRS, OSMOND, 2005). Em aves recém-nascidas,

expostas ao PFOA *in ovo*, previamente à incubação, a frequência cardíaca foi reduzida em 7,9% na dose de 0,5 µg/g e aumentada em 55,3% e 52,9% nas doses de 1 µg/g e 2 µg/g, respectivamente. Também houve, nas maiores doses, redução da espessura da parede do ventrículo direito em 20,2% (1 µg/g) e 22,7% (2 µg/g) (JIANG et al., 2012). Em embriões com 7 dias de incubação, expostos às mesmas concentrações de PFOA empregadas neste trabalho, não houve alterações significativas na espessura da parede dos ventrículos e nas densidades numérica e volumétrica de cardiomiócitos (DA SILVA, 2016). A utilização de embriões nos estádios 16-18 não mostrou efeito cardiotoxico da exposição ao PFOA e ao Cd através da análise da frequência cardíaca, uma vez que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos testados, em relação ao grupo veículo. Uma vez que as análises morfológica e morfométrica do coração não foram possíveis e a análise da frequência cardíaca não revelou alterações significativas, estágios mais avançados do desenvolvimento do embrião de galinha devem ser utilizados para avaliar a cardiotoxicidade do Cd e do PFOA nesse modelo.

Em 2011, Hagenaars e colaboradores mostraram que a exposição de embriões de *Danio rerio* ao PFOA causa redução do débito cardíaco, com edema pericárdico e redução da frequência cardíaca, 48 horas após a fertilização (hpf). Por outro lado, há um aumento da frequência cardíaca dos embriões 72 hpf. Houve correlação entre a frequência cardíaca dos embriões na eclosão (72 hpf) e o comprimento dos embriões 120 hpf. Dessa forma, os autores sugerem que o aumento da frequência cardíaca está relacionado ao menor comprimento dos embriões e não ao efeito direto do PFOA. Nesses embriões também foram observadas outras malformações como curvatura anormal da cauda, bexiga natatória não inflada, edema de saco vitelínico, além de atraso na eclosão (HAGENAARS et al., 2011). No presente trabalho não houve alteração da frequência cardíaca e do comprimento corporal dos embriões expostos ao Cd e PFOA.

Em humanos já foi relatado aumento da prevalência de problemas cardiovasculares, como angina, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, em população exposta ao PFOA pela água contaminada por resíduos de indústria de Teflon (ANDERSON-MAHONEY et al., 2008). Também foi relatada associação entre níveis séricos de PFOA e a presença de doenças cardiovasculares e doença arterial periférica (SHANKAR; XIAO; DUCATMAN, 2012).

A utilização do marcador fluorescente para o Cd (Leadmium Green AM Dye) permite a detecção de concentrações micromolares de Cd (LIFE TECHNOLOGIES, 2007). Nos embriões expostos percebe-se uma maior deposição de Cd na região do tubo neural,

podendo-se, dessa forma, relacionar diretamente a presença de Cd nessa estrutura com a maior incidência de malformações no tubo neural. Estudos futuros são necessários para aprofundar a investigação sobre a distribuição espacial e temporal do Cd nos embriões. Na literatura não há dados ou metodologia sobre a utilização desse marcador em embrião de galinha. Estudos que aplicaram essa marcação analisaram a presença do Cd por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo em células em cultura (LI et al., 2007; MAHTO; YOON; RHEE, 2010; ZELLER et al., 2010; MALAIYANDI; SHARTHIYA; DINELEY, 2016) e em tecidos de plantas (LI et al., 2012; JIANG et al., 2014; BRUNETTI et al., 2015), impossibilitando a extrapolação para o modelo usado nesse trabalho.

A teratologia estuda as malformações congênitas, descritas como alterações estruturais, comportamentais, funcionais ou metabólicas exibidas ao nascimento e têm como origem as alterações mais precoces destacando a importância do presente estudo. Em humanos, muitas das malformações se originam entre a terceira e a oitava semanas de gestação (SADLER, 2016), o que permite dentro de limites aceitáveis relacionar os sinais precoces de diversas deformidades observadas neste estudo com a quarta/quinta semana de desenvolvimento humano (SADLER, 2016; HILL, 2017). Este é um aspecto de grande relevância para a embriotoxicologia humana e para discutir o risco de exposição humana aos xenobióticos testados neste trabalho. Na análise morfológica realizada foram observadas alterações na região encefálica, do tronco, caudal, tubo neural, parede do corpo e curvatura do corpo do embrião como consequência da exposição aos contaminantes estudados. Porém, a incidência de malformações foi significativamente maior somente nos grupos expostos ao Cd 25 µg/ml, PFOA, e à mistura, quando comparados com o grupo veículo. Estes resultados, *per se*, já demonstram o grande potencial tóxico destes xenobióticos para a integridade do desenvolvimento do embrião humano, haja vista a diversidade de tecidos alvos possíveis de serem alterados pela exposição. Apesar disso, é importante ressaltar que mesmo nos grupos em que não houve diferença estatística, também foram encontradas alterações em estruturas importantes para a sobrevivência do embrião. As alterações encontradas no sistema nervoso, na região caudal, curvatura corporal e parede do corpo corroboram com os descritos por Yamamoto e colaboradores (2012), em que embriões de galinha expostos às concentrações de 0,5 µg/ml e 5 µg/ml de Cd apresentaram as mesmas malformações observadas no presente trabalho. Em termos gerais há fortes evidências de que as alterações morfológicas observadas nos embriões de *G. gallus* expostos ao Cd e ao PFOA serão responsáveis por defeitos congênitos na formação do embrião, podendo inviabilizar o seu desenvolvimento ou gerar alterações teratogênicas que podem comprometer a própria sobrevivência do recém-nascido.

Gandara (2002) corrobora com esta hipótese com base nas similaridades morfológicas apresentadas pelos embriões de vertebrados nos estágios iniciais do desenvolvimento. Neste caso o autor destaca a gastrosquise, que é um defeito caracterizado pela presença de abertura na região abdominal, levando à possível extrusão de vísceras. Este tipo de malformação, defeito na parede do corpo, deve-se ao fechamento anormal da parede ventral pelas dobras da parede lateral do corpo, na região torácica, abdominal ou pélvica. De forma mais complexa, estes danos geram além da gastrosquise, a *ectopia cordis* (coração total ou parcialmente para fora da cavidade torácica) e extrofia da bexiga (SADLER; FELDKAMP, 2008). Assim, pode-se inferir que as alterações observadas nos embriões expostos ao Cd e ao PFOA são compatíveis com futura *ectopia cordis*, gastrosquise ou extrofia da bexiga, dependendo da região afetada. As complicações clínicas associadas variam, porém as três condições podem ser total ou parcialmente corrigidas cirurgicamente (CALCAGNOTTO et al., 2013; DICKSON, 2014; FLORES-TLALMIS et al., 2015). Apesar da possibilidade de correção, comorbidades associadas a gastrosquise, como anomalias congênitas circulatórias, pulmonares e sepse elevam a letalidade pós-natal dessa condição (LAO et al., 2010). A *ectopia cordis* está comumente associada a outras cardiopatias que também podem influenciar na sobrevivência do paciente (FLORES-TLALMIS et al., 2015). A letalidade associada à extrofia da bexiga está relacionada a danos e mau funcionamento renais (DICKSON, 2014).

As alterações encefálicas e de tubo neural observadas no presente estudo podem, futuramente, estar relacionadas ao aparecimento de diferentes tipos de defeitos do tubo neural (DTN). Os DTN são malformações congênitas graves ocasionadas por falha no fechamento do tubo neural. Os dois tipos mais comuns dessas deformidades são a anencefalia (ausência de encéfalo e crânio), como consequência do não fechamento da extremidade craniana do tubo neural (BONHOTAL, 2015), e a mielomeningocele (espinha bífida aberta), que resulta da falha do fechamento do tubo neural na região da coluna vertebral. Uma forma mais rara dessas malformações é a craniorraquisquise (anencefalia e espinha bífida aberta), resultante da falha do fechamento do tubo neural em todo o eixo corporal. O fato destas alterações estarem presentes nos embriões expostos aos xenobióticos testados sob condições realísticas é preocupante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que a exposição de gestantes a estas substâncias não é incomum. Além disso, existem ainda outros quatro tipos de DTN, a encefalocele, resultante da protusão de tecido cerebral e das meninges para fora do crânio, a meningocele (espinha bífida fechada), o disrafismo espinhal oculto (espinha bífida oculta) (MITCHELL, 2005), e a iniencefalia (prolapso cerebral e retroflexão da cabeça) (TEJERIZO-GARCÍA et al., 2006; CHEN, 2007), as quais potencialmente podem ser consequência de

algumas das modificações observadas. As características clínicas de cada uma dessas malformações variam. A anencefalia e a craniorraquisquise são sempre letais, enquanto que a letalidade da encefalocele depende da extensão da lesão cerebral. A espinha bífida pode ser tratada cirurgicamente, porém compromete a função neural e pode causar perda da sensibilidade e capacidade de andar. Recém-nascidos com iniencefalia vão a óbito em poucas horas (KULAYLAT; NARCHI, 2000). Outras manifestações clínicas associadas aos DTN são a hidrocefalia, atraso no desenvolvimento mental e no crescimento, problemas de visão, convulsões, distúrbios genitourinários, gastrointestinais e malformações nas vértebras (COPP; STANIER; GREENE, 2013). Além disso, um estudo recente mostrou que a exposição de camundongos ao CdCl_2 *in utero*, no 8º dia de gestação, promove defeito no tubo neural e afeta o crescimento fetal, com redução do peso e comprimento do feto de forma dose dependente (ZHANG et al., 2016).

A síndrome da regressão caudal é uma malformação congênita rara dos segmentos inferiores da coluna vertebral e medula espinhal. Foi descrita pela primeira vez por Duhamel (1961), como um conjunto de defeitos congênitos envolvendo diferentes graus de alterações musculoesqueléticas da coluna lombossacral, pelve e extremidades inferiores, além de alterações neurológicas, genitourinárias, gastrointestinais e cardíacas. Essas alterações ocorrem devido à formação insuficiente de mesoderme na região mais caudal do embrião, durante a gastrulação (SADLER, 2016). O quadro clínico depende da severidade da regressão e encurtamento do tronco, que varia de agenesia parcial do cóccix a agenesia lombossacral. Também podem ocorrer anomalias associadas como limitação da mobilidade articular do quadril, joelhos e tornozelos, imperfuração anal, malformações genitais, displasia ou aplasia renal e sirenomielia (membros inferiores fundidos) (SEN; PATEL, 2007; BAYRAKTUTAN; KANTARCI; SADE, 2015). Se associada à aplasia renal bilateral, essa malformação é letal (SEN; PATEL, 2007). Entre as malformações na região caudal observadas nos embriões expostos ao Cd e PFOA está a redução do comprimento, muitas vezes acompanhada de comprometimento também da região do tronco. Essas alterações são compatíveis com futuras complicações relacionadas à síndrome da regressão caudal. Outras malformações congênitas da coluna vertebral, como a lordose e a escoliose, são consequência da formação e/ou segmentação anormal das vértebras, provenientes do esclerótomo dos somitos, sob influências de fatores genéticos e ambientais (LONSTEIN, 1999; FARLEY, 2010). Devido a essa origem embrionária das vértebras, podemos fazer uma relação direta entre a presença do Cd nos somitos, observada nos embriões de *Gallus gallus* expostos no presente trabalho, e as alterações de curvatura observadas, que darão origem a essas alterações vertebrais. Nos casos

mais graves podem ocorrer alterações cardíacas, urogenitais e paraplegia (LEE, 2015). Thompson e Bannigan (2007) mostraram que a exposição de embriões de galinha a 5 µg/ml de Cd induz a lordose, curvatura anormal na região lombossacral e redução do número de somitos em relação aos embriões controles normais. Também foi relatado um defeito na parede do corpo, compatível com a onfalocele humana, considerada outra malformação associada à lordose. No presente trabalho foram encontradas alterações semelhantes na curvatura da região caudal.

Assim sendo, as malformações observadas no presente trabalho, como causa da exposição ao Cd e PFOA, podem gerar complicações de diferentes gravidades nos indivíduos. Em humanos, algumas das malformações podem ser letais, comprometendo a continuidade da vida do indivíduo em desenvolvimento ou após o nascimento. Outras são potencialmente letais devido às comorbidades. Algumas podem ser corrigidas ou amenizadas cirurgicamente, porém podem diminuir a qualidade de vida do indivíduo devido às complicações associadas. Em animais, as malformações podem aumentar a mortalidade, dificultar a procura por alimento e torná-los mais susceptíveis aos predadores, uma vez que problemas na curvatura e ausência de membros comprometem a locomoção.

Algumas das malformações observadas nos embriões expostos ao Cd e PFOA nesse trabalho já foram observadas em humanos e relacionadas com a exposição a esses contaminantes. Altos níveis de exposição materna ao Cd estão relacionados com maior risco de ocorrência de defeitos cardíacos congênitos (JIN et al., 2016). Porém não há relação entre os níveis maternos de Cd no sangue, urina (BRENDER et al., 2006), na placenta (JIN et al., 2013) e no sangue de neonatos (CARRILLO-PONCE et al., 2004) e a ocorrência de defeitos no tubo neural, mas estes foram observados no presente estudo. Já foi relatada associação entre maiores níveis séricos maternos de PFOA e ocorrência de nascimento prematuro, baixo peso ao nascer e natimortos (WU et al., 2012), além de malformações no sistema nervoso como defeitos do tubo neural e hidrocefalia (STEIN et al., 2014). Porém, Nolan e colaboradores (2010) afirmam não haver relação entre este contaminante e a ocorrência de malformações congênitas, dados estes que parecem ser refutados ou pelo menos discutidos pelas evidências apresentadas neste estudo. Neste caso discute-se aqui uma questão importante, pois embora não haja evidências seguras de que a exposição de gestantes a determinados xenobióticos possa ser a causa direta de alterações no feto ou recém-nascido, os dados deste trabalho sugerem o contrário. As alterações nos estágios iniciais, como evidenciado neste estudo, mostram claramente que estes xenobióticos encontrados no cordão

umbilical alteram de forma significativa o desenvolvimento dos embriões, evidenciando de forma bastante sugestiva a relação entre as lesões apresentadas e as malformações congênitas.

Outro fator importante refere-se à ocorrência de malformações e outras alterações congênitas em determinadas populações estarem relacionadas a aspectos geográficos, genéticos ou mesmo culturais, podendo, assim, influenciar na susceptibilidade aos contaminantes (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; FAGERSTEDT et al., 2015). Neste contexto, segundo Brent (2004) a etiologia da maioria das malformações depende da combinação de fatores genéticos e ambientais. Além disso, limitações relacionadas com os estudos em populações podem subestimar os níveis de exposição materna e não considerar os períodos mais vulneráveis dos embriões/fetos (AL-SALEH, 2014), além de na maioria dos casos levarem em conta somente indivíduos nascidos vivos (NOLAN et al., 2010). Da mesma forma que em seres humanos, as diferenças genéticas dos embriões de diferentes lotes de ovos podem aumentar a variabilidade dos resultados, dificultando o aparecimento de variações estatisticamente significativas na taxa de mortalidade e na ocorrência de malformações.

A ausência de diferenças significativas entre os grupos tratados e os grupos expostos ao Cd (0,5 µg/ml e 5 µg/ml) com os grupos controle podem estar relacionados tanto com os fatores internos e inerentes ao modelo experimental, ou mesmo com o desenvolvimento embrionário (POURLIS, 2011), como também com os estágios muito precoces de avaliação. É possível sugerir que a taxa de mortalidade seria mais visível e aumentaria em estádios mais tardios, uma vez que a presença de intensas malformações impossibilitaria a continuidade do desenvolvimento. Estas hipóteses são reforçadas pela taxa de mortalidade precoce de aproximadamente 5% (até 4 dias de incubação) considerada normal em incubatórios comerciais (ROSSTECH LEAFLETS, 1998; ROSA; AVILA, 2000; BUTCHER; NILIPOUR, 2002; GONZALES, 2005). Nesses locais há um sistema altamente padronizado de controle das variáveis que interferem na viabilidade dos ovos (idade e peso das matrizes, local e temperatura de armazenamento, transporte e higienização dos ovos) para que haja máximo aproveitamento da produção (ROSSTECH, 2010). Assim, considerando que os ovos foram manipulados e incubados de maneira padronizada e nas condições experimentais, pode-se considerar que os níveis de mortalidade observados nos grupos controles encontram-se dentro da normalidade.

Considerando as características morfológicas analisadas, não houve atraso no desenvolvimento frente à exposição ao Cd e PFOA nas concentrações testadas, apesar dos embriões utilizados no presente trabalho, incubados por 72 horas, não apresentarem as características morfológicas de embriões com esse tempo de incubação, segundo a descrição

de Hamburger e Hamilton (1951). Isso ocorreu pois o tempo de incubação foi considerado a partir do momento da colocação dos ovos na incubadora. Porém, o ideal é que se inicie a contagem pelo menos 2 horas após a incubação, tempo para que o desenvolvimento seja retomado (FERREIRA, 2015). Além disso, no trabalho de Hamburger e Hamilton (1951) a temperatura de incubação utilizada para os embriões de 72h foi de 39,4 °C, enquanto que no presente trabalho utilizou-se 38°C. A temperatura de incubação exerce influência significativa na organização das estruturas embrionárias, acelerando ou retardando o desenvolvimento (DIAS; MÜLLER, 1998). Em relação ao Cd, nossos resultados corroboram os de Yamamoto e colaboradores (2012), indicando que o Cd não induz atraso no desenvolvimento em embriões de ave *G. gallus* após 72 horas de incubação. Porém, já foi relatado atraso no desenvolvimento, com retardo na formação dos somitos em embriões de galinha com 3,5 dias de incubação (84 horas) (THOMPSON et al., 2005; CULLINANE; BANNIGAN; THOMPSON, 2009). Em camundongos, a exposição ao PFOA no período gestacional e lactacional às doses de 3 e 5 µg/g induz atraso na abertura dos olhos e no aparecimento de pêlos nos filhotes, caracterizando atraso no desenvolvimento (WOLF et al., 2007). Em *Gallus gallus* não foram encontrados trabalhos que demonstrem retardo no desenvolvimento como consequência da exposição ao PFOA.

A avaliação do efeito de poluentes isoladamente é pouco representativa, considerando uma exposição real no ambiente, uma vez que humanos e animais estão expostos a uma mistura complexa de poluentes. Além disso, essa abordagem leva ao desconhecimento dos possíveis efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos, provocados pelas misturas de poluentes, bem como a má interpretação do risco de exposição a determinadas substâncias (WILSON et al., 2016). Porém, devido a dificuldades conceituais e experimentais, o estudo do efeito de misturas de poluentes em organismos vivos ainda é pouco explorado (KORTENKAMP, 2007).

Estudos que avaliaram a concentração de contaminantes ambientais orgânicos e inorgânicos em gestantes revelam a presença de uma variedade de compostos potencialmente tóxicos no sangue materno e do cordão umbilical, como o Cd e o PFOA (NEEDHAN et al., 2011; SAKAMOTO et al., 2012; ARBUKLE et al., 2013). Isso demonstra que tais moléculas atravessam a barreira placentária e atingem o indivíduo durante o desenvolvimento pré-natal. Dessa forma, a exposição a xenobióticos nessa fase do desenvolvimento pode causar efeitos como as malformações observadas nesse trabalho, que irão refletir nas fases subsequentes do desenvolvimento (infância e vida adulta), gerando diferentes tipos de anomalias. Além disso, a exposição humana a esses contaminantes ocorre pelas mesmas vias principais, a oral e a

respiratória (D'EON; MABURY, 2011; ARBUCKLE et al., 2016). Assim, optou-se neste trabalho pela utilização de uma mistura binária (Cd e PFOA), a fim de simular de forma mais realística uma exposição ambiental.

Considerando as análises realizadas de mortalidade, morfologia, morfometria e frequência cardíaca, não houve efeito aditivo entre o Cd e o PFOA, já que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o grupos expostos ao Cd 0,5 µg/ml e PFOA 5 ng/ml, isoladamente, e o exposto à mistura. Ou seja, apesar da ocorrência de malformações ter sido maior no grupo exposto à mistura do que nas exposições isoladas, esse aumento não foi significativo, indicando que o maior aparecimento de alterações morfológicas ocorreu devido somente à presença do PFOA. Em cianobactérias, a interação do Cd e PFOA em mistura gera um efeito antagônico, avaliado pelo teste de toxicidade de bactérias bioluminescentes. Esse antagonismo é gerado pela estabilização dos cátions do metal por complexação, através de troca iônica entre o metal e o PFOA (RODEA-PALOMARES et al., 2012). No entanto, como neste estudo foram utilizadas as menores concentrações de ambos os xenobióticos, e pelo fato da menor concentração teste do Cd não trazer efeito visível, mas observado na menor concentração teste do PFOA, pode-se sugerir que não há relação significativa da mistura nas concentrações testadas que possa interferir com os efeitos nos embriões.

A morfometria é o estudo da forma em relação ao tamanho, ou seja, do crescimento (PERES-NETO, 1995). Sendo assim, essa análise permitiu verificar se a exposição aos contaminantes altera o padrão de crescimento embrionário com padrão de organização corporal normal, pela análise do corpo total do embrião considerando algumas estruturas embrionárias específicas. A análise morfométrica em embriões de *G. gallus* é um complemento da análise anátomo-morfológica. Apesar dos trabalhos utilizarem embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento neste tipo de abordagem metodológica (4 e 6 dias) (KOBUS, 2007; CECCHINI, 2013), ou mais precoces (40 horas) (DEY; MUKHERJEE; IYENGAR, 1999), foi importante a aplicação deste método nesse trabalho, uma vez que constituiu parâmetros métricos confiáveis e sedimentados. Porém, várias das medidas utilizadas nos dois trabalhos acima não foram adaptadas para os embriões nos estádios 16, 17 e 18 dada a dificuldade e, por vezes, impossibilidade de determinar as delimitações ou pontos exatos de estruturas, sem a utilização de técnicas histológicas.

Através da morfometria anatômica verificou-se uma variação no padrão morfométrico entre os grupos testados, porém em todos os parâmetros analisados a exposição às diferentes concentrações de Cd e PFOA não causou alteração significativa. Sugere-se que a falta de alterações significativas ocorreu devido à impossibilidade da análise dos embriões

com malformações que impossibilitaram a delimitação precisa das estruturas para a realização das medições. Além disso, as comparações foram realizadas em embriões no mesmo estágio de desenvolvimento, uma vez que cada estágio apresenta uma característica morfológica específica. Como a maioria dos embriões obtidos foi no estágio 17 e vários embriões (65) não puderam ser analisados, o "n" amostral dos estágios 16 e 18 não foi suficiente para as análises estatísticas. O parâmetro de área total do embrião poderia ter sido analisado, mesmo nos embriões malformados, uma vez que a mensuração da área do embrião não leva em conta nenhuma estrutura específica. Porém, devido a impossibilidade de determinação do estágio embrionário não foi possível a comparação entre embriões do mesmo estágio para a realização da análise estatística.

A avaliação morfológica através da montagem total não permitiu uma análise eficiente da morfologia e morfometria específicas do coração, visto que a posição do embrião e as extensas alterações encontradas impossibilitaram boa visualização do órgão e sua forma nos estágios de desenvolvimento analisados. Além disso, as lâminas apresentaram os embriões com o coração em diferentes fases do ciclo cardíaco (sístole, diástole, fases intermediárias entre sístole e diástole). Em cada fase do ciclo, o coração apresenta uma forma característica, que varia entre os estágios, devido ao crescimento e desenvolvimento do órgão (NAIEB; HAPPEL; YELBUZ, 2013). Assim, não foi possível encontrar um padrão na apresentação do coração para que mensurações específicas do coração fossem realizadas. Dessa forma, conclui-se que a análise morfométrica não é uma metodologia eficiente para análise de embriões de *Gallus gallus* em montagem total.

Em resumo, os efeitos observados nos embriões no presente trabalho reforçam a preocupação com os potenciais efeitos deletérios da exposição pré-natal ao Cd e PFOA. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado o efeito teratogênico do PFOA em estágios iniciais do embrião de galinha e em coexposição com o Cd. Uma vez que estudos em embriões humanos não são possíveis, a utilização do embrião de galinha como modelo é uma alternativa viável, que oferece diversas vantagens em relação a outros animais, além de permitir extrapolação entre as espécies. Ainda são necessários mais estudos sobre os efeitos desses contaminantes, seus mecanismos de ação e a relação com as malformações encontradas, mas o presente estudo abre várias questões que devem ser investigadas futuramente.

6. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados, conclui-se que:

- A exposição ao Cd e PFOA, isolados e em mistura, nas concentrações testadas, não alterou a frequência cardíaca dos embriões incubados por 72 horas.
- A detecção do Cd pelo marcador específico, confirma a presença do metal no embrião de 3 dias.
- A exposição ao Cd elevou a taxa de mortalidade e ocorrência de malformações somente na maior concentração.
- O PFOA e a mistura não alteraram significativamente a taxa de mortalidade, mas aumentaram a ocorrência de malformações.
- A exposição ao Cd e PFOA, isoladamente e em coexposição, não alterou os padrões morfométricos analisados.
- A morfometria não é uma metodologia eficiente para análise de embriões de ave *Gallus gallus* pela técnica de montagem total.

REFERÊNCIAS

AHRENS, L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 20–31, 2011.

ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. **Altex**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 2015.

AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; MOHAMED, G. E. D.; RABAH, A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 79-101, 2011.

AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; RABAH, A. Birth outcome measures and maternal exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) in Saudi Arabian population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, n. 2-3, p. 205-218, 2014.

ANDERSON-MAHONEY, P.; KOTLERMAN, J.; TAKHAR, H.; GRAY, D.; DAHLGREN, J. Self-reported health effects among community residents exposed to perfluorooctanoate. **New solutions**, v. 18, n. 2, p. 129-143, 2008.

ANDUJAR, P.; BENSEFA-COLAS, L.; DESCATHA, A. Acute and chronic cadmium poisoning. **Revue de Medecine Interne**, v. 31, p. 107-115, 2010.

ARBUCKLE, T. E.; KUBWABO, C.; WLAKER, M.; DAVIS, K.; LALONDE, K.; KOSARAC, I.; WEN, S. W.; ARNOLD, D. L. Umbilical cord blood levels of perfluoroalkyl acids and polybrominated flame Retardants. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 184-194, 2013.

ARBUCKLE, T. E.; LIANG, C. L.; MIRISSET, A-S.; FISHER, M.; WEILER, H.; CIRTU, C. M.; LEGRAND, M.; DAVIS, K.; ETTINGER, A. S.; FRASER, W. D. Maternal and fetal exposure to cadmium, lead, manganese and mercury: The MIREC study. **Chemosphere**, v. 163, p. 270-282, 2016.

ARVANITI, O. S.; STASINAKIS, T. S. Review on the occurrence, fate and removal of perfluorinated compounds during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 524-525, p. 881-92, 2015.

ATSDR - Agency for toxic substances & disease registry. **The ATSDR 2015 Substance Priority List**. Disponível em
<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/atsdr_2015_spl_detailed_data_table.pdf>. Acesso em 02/05/2015.

ATSDR - Agency for toxic substances & disease registry. Toxicological profile for cadmium, 2012.

AVAGLIANO, C.; RUSSO, R.; CAROA, C. D.; CRISTIANO, C.; RANA, G. L.; PIEGARI, G.; PACIELLO, O.; CITRARO, R.; RUSSO, E.; SARRO, G. D.; MELI, R.; RASOA, G. M.; CALIGNANO, A. Palmitoylethanolamide protects mice against 6-OHDA-induced neurotoxicity and endoplasmic reticulum stress: *In vivo* and *in vitro* evidence.

Pharmacological Research, v. 113, Part A, p. 276–289, 2016.

BARTELL, S. M.; CALAFAT, A. M.; LYU, C.; KATO, K.; RYAN, P. B.; STEENLAND, K. Rate of Decline in Serum PFOA Concentrations after Granular Activated Carbon Filtration at Two Public Water Systems in Ohio and West Virginia. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 222-228, 2010.

BATTAGLIN, W.; DREWES, J.; BRUCE, B.; MCHUGH, M. Introduction: contaminants of emerging concern in the environment. **Water resources impact**, v. 9, n.3, p. 3-4, 2007.

BAYNE, B. L., BROWN, D. A., BURNS, K., DIXON, D. R., IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D. A., LOWE, D. M., MOORE, M. N., STEBBING, A. R. D., WIDDINGS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals**. New York: Praeger, 1985.

BAYRAKTUTAN, U.; KANTARCI, M.; SADE, R. Caudal regression syndrome with diastematomyelia, multiple vertebral anomalies, and rotoscoliosis in an adult. **The Spine Journal**, v. 15, p. e47-e48, 2015.

BEGLEY, T. H.; HSU, W.; NOONAN, G.; DIACHENKO, G. Migration of fluorochemical paper additives from food-contact paper into foods and food simulants. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 3, p. 384–390, 2008.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2005.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. **Biochimie**, v. 88, p. 1549-1559, 2006.

BETTS, K. S. Perfluoroalkyl acids: What is the evidence telling us? **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. A250-A256, 2007.

BIEGEL, L. B.; HURTT, M. E.; FRAME, S. R.; O'CONNOR, J. C.; COOK, J. C. Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. **Toxicological Sciences**, v. 60, p. 44–55, 2001.

BOEKELHEIDE, K. BLUMBERG, B.; CHAPIN, R. E.; COTE, I.; GRAZIANO, J. H.; JANESICK, A.; LANE, R.; LILLYCROP, K.; MYATT, L.; STATES, C.; THAYER, K. A.; WAALKES, M. P.; ROGERS, J. M. Predicting Later-Life Outcomes of Early-Life Exposures. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, 2012.

BONHOTAL, S. Screening and Risk Factors for Anencephaly. **The Journal of Nurse Practitioners**, v. 11, n. 3, p. 371-372, 2015.

BRENDER, J. D.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; GILANI, Z.; STINCHCOMB, D.; MOODY, K.; HENRY, J.; HENDRICKS, K. Maternal exposure to arsenic, cadmium, lead,

and mercury and neural tube defects in offspring. **Environmental Research**, v. 101, n. 1, p. 132-139, 2006.

BRENT, R. L. Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors. **Pediatrics**, v. 113, n. 4, p. 957-968, 2004.

BRUNETTI, P.; ZANELLA, L.; PAOLIS, A.; LITTA, D. D.; CECCHETTI, V.; FALASCA, G.; BARBIERI, M.; ALTAMURA, M. M.; COSTANTINO, P.; CARDARELLI, M. Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter *AtABCC3* increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 13, p. 3815-3829, 2015.

BRUNSTRÖM, B. induction of 7-ethoxyresorufin O-deethylase in chick embryos by polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons having Ah receptor affinity. **Chemico-biological interactions**, v. 81, p. 69-77, 1992.

BUCK, R. C.; FRANKLIN, J.; BERGER, U.; CONDER, J. M.; COUSINS, I. T.; DE VOOGT, P.; JENSEN, A. A.; KANNAN, K.; MABURY, S.A.; VAN LEEUWEN, S. P. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 513-41, 2011.

BUTCHER, G. D.; NILIPOUR, A. H. **Broiler management – The first 24 hours**. Gainesville: University of Florida - Institute of Food and Agricultural Sciences, 2002. 4p.

CALAFAT, A. M.; KUKLENYIK, Z.; REIDY, J. A.; CAUDILL, S. P.; TULLY, J. S.; NEEDHAM, L. L. Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the US population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 2237-2242, 2007.

CALCAGNOTTO, H.; MÜLLER, A. L. L.; LEITE, J. C. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; GOMES, K. W.; MAGALHÃES, J. A. A. Fatores associados à mortalidade em recém-nascidos com gastrosquise. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 12, 2013.

CARDOSO, O. O.; JÚLIO, F. C.; ALVES, R. I. S.; BAENA, A. R.; DEZ, I. G.; SUZUKI, M. N.; CELERE, B. S.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Concentration profiles in breast milk, drinking water and soil: relationship between matrices. **Biological Trace Element Research**, v.160, p. 116-122, 2014.

CARRILLO-PONCE, M. L.; MARTÍNEZ-ORDAZ, V. A.; VELASCO-RODRÍGUEZ, V. M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; HERNÁNDEZ-SERRANO, M. C.; SANMIGUEL, F. Serum lead, cadmium, and zinc levels in newborns with neural tube defects from a polluted zone in Mexico. **Reproductive Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 149-154, 2004.

CAS - Chemical Abstract Service - A division of the American Chemical Society. Disponível em <<http://www.cas.org/>>. Acesso em 22/02/2017.

CECCHINI, M. S. **EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO E DA HOMOCISTEÍNA SOBRE OS PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR NO TELENÉFALO DE EMBRIÕES DE *GALLUS DOMESTICUS***. 55 f. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CHANG, Y. F.; WEN, J. F.; CAI, J. F.; XIAO-YING, W.; YANG, L.; GUO, Y. D. An investigation and pathological analysis of two fatal cases of cadmium poisoning. **Forensic Science International**, v. 220, p. e5-e8, 2012.

CHEN, C-P. Prenatal diagnosis of iniencephaly. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 46. n. 3, p. 199-208, 2007.

CHOONG, G.; LIU, Y.; TEMPLETON, D.M. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 25, n. 211, p. 54-65, 2014.

CHRISTENSEN, V. L. Factors associated with early embryonic mortality. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p. 359-372, 2001.

COPP, A. J.; STANIER, P.; GREENE, N. D. E. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions and controversies. **Lancet Neurology**, v. 12, p. 799-810, 2013.

CULLINANE, J.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Cadmium teratogenesis in the chick: Period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 335-341, 2009.

DA SILVA, L. M. **Ação do ácido perfluorooctanóico (pfoa) em coração de embriões de *Gallus gallus*: um estudo morfométrico e estereológico**. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

DA SILVA, C. P.; DE ALMEIDA, T. E.; ZITTEL, R.; STREMEL, T. R. O.; DOMINGUES, C. E.; KORDIAK, J.; DE CAMPOS, S. X. Translocation of metal ions from soil to tobacco roots and their concentration in the plant parts. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 663, 2016.

DAUGHTON, C. G. Non-regulated water contaminants: emerging research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 20, p. 711-732, 2004.

DAVEY, M. G.; JAMES, J.; PATON, I. R.; BURT, D. W.; TICKLE, C. Analysis of *talpid*³ and wild-type chicken embryos reveals roles for *Hedgehog* signalling in development of the limb bud vasculature. **Developmental Biology**, v. 301, n. 1, p. 155-165, 2007.

DECUYPERE, K; MICHELS, H. Incubation temperature as a management tool: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 48, p. 27-38, 1992.

D'EON, J. C.; MABURY, S. A. Is Indirect Exposure a Significant Contributor to the Burden of Perfluorinated Acids Observed in Humans? **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 19, p. 7974-7984, 2011.

DEPARTMENT OF HEALTH - AUSTRALIAN GOVERNMENT. **Australian guidance values for assessing exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA)**. 2017. Disponível em <[http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/388A358669244F3CCA2580F70009145F/\\$File/DEPT006.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/388A358669244F3CCA2580F70009145F/$File/DEPT006.pdf)>. Acesso em 06/04/2017.

DEWITT, J. C.; COPELAND, C. B.; STRYNAR, M. J.; LUEBKE, R. W. Perfluorooctanoic acid-induced immunomodulation in adult C57BL/6J or C57BL/6N female mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 644–650, 2008.

DEY, N.; MUKHERJEE, A.; IYENGAR, B. A simultaneous *ex vivo* model of embryogenesis: I. Organogenesis. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 43, n. 3, p. 305-314, 1999.

DIAS, P. F.; MÜLLER, Y. M. R. Features of the embryonic development of *Gallus gallus domesticus* in different temperatures and times of incubation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 5, p. 233-235, 1998.

DICKSON, A. P. The Management of Bladder Exstrophy: The Manchester Experience. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 49, n. 2, p. 244-250, 2014.

DOI, T.; PURI, P.; MCCANN, A.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Epigenetic Effect of cadmium on Global De Novo DNA Hypomethylation in the Cadmium-Induced Ventral Body Wall Defect (VBWD) in the Chick Model. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 2, p. 475-480, 2011.

DOMINGO, J. L. Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. **Environmental International**, v. 40, p. 187-195, 2012.

DREYER, A.; WEINBERG, I.; TEMME, C.; EBINGHAUS, R. Polyfluorinated compounds in the atmosphere of the Atlantic and Southern oceans: evidence for a global distribution. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 6507-6514, 2009.

DUHAMEL, B. From the mermaid to anal imperforation: The syndrome of caudal regression. **Archives of Disease in Childhood**, v. 36, p. 152-155, 1961.

DUPIN, E.; ZILLER, C.; LE DOUARIN, N. M. The Avian Embryo as a Model in Developmental Studies: Chimeras and *in vitro* Clonal Analysis. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 36, p. 1-35, 1997.

ECHEVESTE, P.; GALBÁN-MALAGÓN, C.; DACHS, J.; BERROJALBIZ, N.; AGUSTÍ, S. Toxicity of natural mixtures of organic pollutants in temperate and polar marine phytoplankton. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 34–41, 2016.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) under TSCA**. Disponível em < <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/and-polyfluoroalkyl-substances-pfass-under-tsca#tab-3> >. Acesso em 27/02/2017.

FAGERSTEDT, S.; KIPPLER, M.; SCHEYNIUS, A.; GUTZEIT, C.; MIE A; ALM, J.; VAHTER, M. Anthroposophic lifestyle influences the concentration of metals in placenta and cord blood. **Environmental Research**, v. 113. p. 88-96, 2015.

FARLEY, F. A. Etiology of Congenital Scoliosis. **Seminars in Spine Surgery**, v. 22, p. 110-112, 2010.

FERREIRA, F. F. **Toxicidade do metilmercúrio (MeHg) sobre a organização das camadas da medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus***. 101 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FLORES-TLALMIS, P.; MADRID-BASURTO, A.; GARCÍA-CANO, E.; HERNÁNDEZ-ZAMORAD, V. Surgical repair of thoraco-abdominal ectopia cordis. **Cirugía Cardiovascular**, v. 22, n. 2., p. 104-107, 2015.

FROMME, H.; TITTELMIER, S.,A.; VÖLKEL, W.; WILHELM, M.; TWARDILLA, D. Perfluorinated compounds - exposure assessment for the general population in western countries. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, p. 239-270, 2009.

GANDARA, C. A. T. **Modelo experimental para o estudo da gastrosquise e embriões de galinha**. 153 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

GLASSMEYER, S. T. The cycle of emerging contaminants. **Water resources impact**, v. 9, n.3, p. 5-7, 2007.

GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; PELLETIER, E.; VOIGT, C. L.; RANDI, M. A. F.; CAMPOS, S. X.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 4, p. 251-259, 2016.

GONZALES, E. Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico. In: ZOOTECA, 2005, Campo Grande - MS. **Anais do Zootec 2005**.

GUNEY, M.; ZAGURY, G. J. Heavy metals in toys and low-cost jewelry: critical review of US and Canadian legislations and recommendations for testing. **Environmental Science & Technology**, v.46, p. 4265-4274, 2012.

HADANI, A.; EGYED, M. N. Use of the chick embryo for testing the toxicity of cholinesterase-inhibiting compounds. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 10, p. 313-321, 1967.

HAGENAARS, A.; VERGAUWEN, L.; DE COEN, W.; KNAPEN, D. Structure-activity relationship assessment of four perfluorinated chemicals using a prolonged zebrafish early life stage test. **Chemosphere**, v. 82, n. 5, p. 764-772, 2011.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, p. 231-272, 1951.

HANSEN, L.; DURAREV, A. A.; HUBER, S.; ODLAND, J. O.; NIEBOER, E.; SANDANGER, T. M. Partition of perfluoroalkyl substances (PFASs) in whole blood and plasma, assessed in maternal and umbilical cord samples from inhabitants of arctic Russia and Uzbekistan. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 430–437, 2013.

HEO, J.-J.; LEE, J.-W.; KIM, S.-K.; OH, J.-E. Foodstuff analyses show that seafood and water are major perfluoroalkyl acids (PFAAs) sources to humans in Korea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 402–409, 2014.

HILL, M. A. **Embryology Carnegie Stage Comparison**. Disponível em <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison>. Acesso em 02/03/2017.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Cadmium and cadmium compounds. **IARC Monographs**, v. 110C, p. 121–146, 2012.

ICdA - International Cadmium Association. **Introduction**. Disponível em <<http://www.cadmium.org/introduction>>. Acesso em 25/01/2017. a.

ICdA - International Cadmium Association. **Level of cadmium in the environment**. Disponível em <<http://www.cadmium.org/environment/level-of-cadmium-in-the-environment>>. Acesso em 25/01/2017. b.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 248, 2011.

JIANG, Q.; LUST, R. M.; STRYNAR, M. J.; DAGNINO, S.; DEWITT, J. C. Perfluorooctanoic acid induces developmental cardiotoxicity in chicken embryos and hatchlings. **Toxicology**, v. 293, p. 97-106, 2012.

JIANG, Z.; ZHANG, H.; QIN, R.; ZOU, J.; WANG, Z.; SHI, Q.; JIANG, W.; LIU, D. Effects of Lead on the Morphology and Structure of the Nucleolus in the Root Tip Meristematic Cells of *Allium cepa* L. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 13406-13423, 2014.

JIN, L.; ZHANG, L.; LI, Z.; LIU, J.-M.; YE, R.; RENA, A. Placental concentrations of mercury, lead, cadmium, and arsenic and the risk of neural tube defects in a Chinese population. **Reproductive Toxicology**, v. 35, p. 25-31, 2013.

JIN, X.; TIAN, X.; LIU, Z.; HU, H.; LI, X.; DENG, Y.; LI, N.; ZHU, J. Maternal exposure to arsenic and cadmium and the risk of congenital heart defects in offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 59, p. 109-116, 2016.

JOHNSON, J. D.; GIBSON, S. J.; OBER, R. E. Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium perfluorooctanoate or potassium perfluorooctanesulfonate. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 4, p. 972–976, 1984.

JONES, P. D.; HU, W. Y.; DE COEN, W.; NEWSTED, J. L.; GIESY, J. P. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 22, p. 2639–2649, 2003.

JULIN, B.; WOLK, A.; BERGKVIST, L.; BOTTAI, M.; AKESSON, A. Dietary Cadmium Exposure and Risk of Postmenopausal Breast Cancer: A Population-Based Prospective Cohort Study. **Cancer Research**, v. 72, n. 6, p. 1459-1466, 2012 a.

JULIN, B.; WOLK, A.; JOHANSSON, J. E.; ANDERSSON, S. O.; ANDRÉN, O.; AKESSON, A. Dietary cadmium exposure and prostate cancer incidence: a population-based prospective cohort study. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 895-900, 2012 b.

JURCZUK, M.; BRZOSKA, M. M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; GALAZYN-SIDORCZUK, M.; KULIKOWSKA-KARPINSKA, E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 429–438, 2004.

KANNO, T. Y. N.; ESPREAFICO, E. M.; YAN, C. Y. I. Role o myosin Va in neuritogenesis of chick dorsal root ganglia nociceptive neurons. **Cell Biology International**, v. 38, n. 3, p. 388-394, 2014.

KIPPLER, M.; HOQUE, A. M.; RAQIB, R.; OHRVIK, H.; EKSTROM, E. C.; VAHTER, M. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 2, p. 162-168, 2010.

KOBUS, K. **Ação da homocisteína e do ácido fólico sobre o padrão morfológico e estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus***. 85 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing Chicken Eggs for Developmental Studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 8, e306, 2007.

KORTENKAMP, A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 98-105, 2007.

KULAYLAT, N. A.; NARCHI, H. Iniencephaly: An uncommon neural tube defect. **Journal of Pediatrics**, v. 136, p. 414, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KÜMMERER, K. Emerging contaminants. In: WILDERER, P. **Treatise on Water Science**. Oxford: Academic Press, 2011, v. 3, p. 69-88.

LAO, O. B.; LARISON, C.; GARRISON, M. M.; WALDHAUSEN, J. H. T.; GOLDIN, A. B. Outcomes in Neonates with Gastroschisis in U.S. Children's Hospitals. **American Journal of Perinatology**, v. 27, n.1, p. 97–101, 2010.

LEE, M. C. Congenital Spinal Deformity. **Medscape**, 2015. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/1260442-overview#a1>>. Acesso em 17/04/2017.

LEE, Y. J.; KIM, M-K.; BAE, J.; YANG, J-H. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. **Chemosphere**, v. 90, p. 1603-1609, 2013.

LEWIS, G. P.; COUGHLIN, L. L.; JUSKO, W. J.; HARTZ, S. Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. **The Lancet**, v. 299, p. 291–292, 1972.

LI, L.; LIU, X.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; ZHAO, J.; CHEN, X.; YU, J.; WU, H. Pathways of cadmium fluxes in the root of the halophyte *Suaeda salsa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 75, p. 1-7, 2012.

LI, Z.; DONG, T.; PRÖSCHEL, C.; NOBLE, M. Chemically diverse toxicants converge on Fyn and c-Cbl to disrupt precursor cell function. **PLoS Biology**, v. 5, n. 2, p. 212-231, 2007.

LIEN, G-W.; HUANG, C-C.; WU, K-Y.; CHEN, M-H.; LIN, C-Y.; CHEN, C-Y.; HSIEH, W-S.; CHEN, P-C. Neonatal-maternal factors and perfluoroalkyl substances in cord blood. **Chemosphere**, v. 92, p. 843-850, 2013.

LIFE TECHNOLOGIES. Leadmium™ Green AM Dye for Intracellular Detection of Lead and Cadmium. **Molecular Probes**, 2007.

LONSTEIN, J. E. Congenital spine deformities: scoliosis, kyphosis, and lordosis. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 387-405, 1999.

MAHTO, S. K.; YOON, T. H.; RHEE, S. W. A new perspective on *in vivo* assesment method for evaluating quantum dot toxicity by using microfluids technology. **Biomicrofluidics**, v. 4, n. 3, p. 034111.1-034111.8, 2010.

MALAIYANDI, L. M.; SHARTHIYA, H.; DINELEY, K. E. Fluorescence detection of intracellular cadmium with Leadmium Green. **BioMetals**, v. 29, n. 4, p. 625-635, 2016.

MATOVIC, V.; BUHA, A.; DUKIC-COSIC, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2015.

MITCHELL, L. E. Epidemiology of neural tube defects. **American Journal of Medical Genetics**, v. 135C, p. 88-94, 2005.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Convenção de Estocolmo**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>> Acesso em 10/05/2015.

MONROY, R.; MORRISON, K.; TER, K.; ATKINSON, S.; KUBWABO, C.; STEWART, B.; FOSTER, W. G. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. **Environmental Research**, v. 108, p. 56– 62, 2008.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M.G. **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**. 9 ed. Philadelphia, Saunders, 2013.

MOUSSA, W. M. Determination of lead and cadmium in human milk and measure some of its composition. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 236, 2011.

MURRAY, K. E.; THOMAS, S. M.; BODOUR, A. A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3462–3471, 2010.

NAIEB, S. A.; HAPPEL, C. M.; YELBUZ, T. M. A detailed atlas of chick heart development *in vivo*. **Annals of Anatomy**, v. 195, n. 3, p. 324–341, 2013.

NAWROT, T.; PLUSQUIN, M.; HOGERVORST, J.; ROELS, H. A.; CELIS, H.; THIJS, L.; VANGRONVELSD, J.; VAN HECKE, E.; STAESSEN, J. A. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. **The lancet oncology**, v. 7, p. 119–26, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological Markers in Environmental Health Research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, n. 1, p. 3, 1987.

NEEDHAM, L. L.; GRANDJEAN, P.; HEINZOW, B.; JØRGENSEN, P. J.; NIELSEN, F.; PATTERSON JR, D. G.; SJÖDIN, A.; TURNER, W. E.; WEIHE, P. Partition of Environmental Chemicals between Maternal and Fetal Blood and Tissues. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1121–1126, 2011.

NOLAN, L. A.; NOLAN, J. M.; SHOFR, F. S.; RODWAY, N. V.; EMMETT, E. A. Congenital anomalies, labor/delivery complications, maternal risk factors and their relationship with perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 147–155, 2010.

OLSEN, G. W.; BURRIS, J. M.; EHRESMAN, D. J.; FROEHLICH, J. W.; SEACAT, A. M.; BUTENHOFF, J. L.; ZOBEL, L. R. Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 1298–1305, 2007.

OLSZOWSKI, T.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; REBACZ-MARON, E.; GUTOWSKA, I.; JAMIOL, D.; PROKOPOWICZ, A.; GOSCHORSKA, M.; CHLUBEK, D. Cadmium concentration in mother's blood, milk, and newborn's blood and its correlation with fatty acids, anthropometric characteristics, and mother's smoking status. **Biological Trace Element Research**, v. 174, n. 1, p. 8–20, 2016.

ORTOLANI-MACHADO, C. F.; RIOS, F. S.; FREITAS, P. F.; OKADA, M. A.; RODRIGUES-GALDINO, A. M.; MAIOLINO, C. V.; TAMADA, M. H. Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. **Técnicas e métodos para a utilização prática em microscopia**. Editora Santos, 2012. 237–294.

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 157–60, 1994.

PENG, L.; WANG, X.; HUO, X.; XU, X.; LIN, K.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; WU, K. Blood cadmium burden and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Chinese Chaoshan population. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 12323-12331, 2015.

PERES-NETO, P. R. Introdução a análises morfofométricas. In: P.R. PERES-NETO; J.L. VALENTIN & F.A.S. FERNANDEZ (Eds). **Tópicos em tratamentos de dados biológicos**. Rio de Janeiro, Univ. Federal do Rio de Janeiro, 161p, p. 57-89, 1995.

PINKAS, A.; SLOTKIN, T. A.; BRICK-TURIN, Y.; VAN DER ZEE, E. A.; YANAI, J. Neurobehavioral teratogenicity of perfluorinated alkyls in an avian model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 182-186, 2010.

POURLIS, A. F. Developmental malformation in avian species. Manifestation of unknown or genetic etiology – a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n.5, p. 401-415, 2011.

POULSEN, L. L. C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, p. 631–639, 2012.

PREVEDOUROS, K.; COUSINS, I. T.; BUCK, R. C.; KORZENIOWSKI, S. H. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 32–44, 2006.

RAHBAR, M. H.; SAMMS-VAUGHAN, M.; DICKERSON, A. S.; LOVELAND, K. A.; ARDJOMAND-HESSABI, M.; BRESSLER, J.; LEE, M.; SHAKESPEARE-PELLINGTON, S.; GROVE, M. L.; PEARSON, D. A.; BOERWINKLE, E. Role of fruits, grains, and seafood consumption in blood cadmium concentrations of Jamaican children with and without Autism Spectrum Disorder. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v. 8, p. 1134-1145, 2014.

ROBINSON, J. F.; YU, X.; MOREIRA, E. G.; HONG, S.; FAUSTMAN, E. M. Arsenic- and cadmium-induced toxicogenomic response in mouse embryos undergoing neurulation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n. 2, p. 117-129, 2011.

RODEA-PALOMARES, I.; LEGANÉS, F.; ROSAL, R.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F. Toxicological interactions of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) with selected pollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 201-202, p. 209-218, 2012.

RONCO, A. M.; ARGUELLO, G. M.; GRAS, N. L. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. **Biomaterials**, v. 18, p. 233-241, 2005.

ROSA, P. S.; AVILA, V. S. **Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte**. Concórdia: Embrapa suínos e aves, 2000. Comunicado técnico EMBRAPA.

ROSENBRUCH, M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. **Altex**, v.14, p. 111-113, 1997.

ROSSTECH LEAFLETS. Investigating hatchery practice. **Ross Tech** 98/35, 1998. 15 p.

ROSSTECH. Como investigar as práticas de incubação. **Ross Tech** 08/47, 2010. 48 p.

RUDGE, C. V; RÖLLIN, H. B; NOGUEIRA, C. M.; THOMASSEN, Y.; RUDGEA, M. C.; ODLANDG, J. Ø. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, n. 7, p. 1322-1330, 2009.

RUTLEDGE, J. C. Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 369, n. 1-2, p. 113-127, 1997.

SAKAMOTO, M.; CHAN, H. M.; DOMINGO, J. L.; KUBOTA, M.; MURATA, K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 179-184, 2012.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SADLER, T. W.; FELDKAMP, M. L. The embryology of body wall closure: Relevance to gastroschisis and other ventral body wall defects. **American Journal of Medical Genetics**, v. 148, part C, p. 180-185, 2008.

SALVATORI, F.; TALASSI, C. B.; SALZGEBER, S. A.; SPINOSA, H. S. BERNARDI, M. M. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 673-680, 2004.

SANTOS, L. F. P.; TRIGUERIO, I. N. S.; LEMOS, V. A.; NÓBREGA, F. D. M.; CARDOSO, R. Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. **Food control**, v. 33, p. 193-199, 2013.

SCHÜLER-FACCINI, L.; SANSEVERINO, M. T. V.; ABECE, A. M.; VIANNA, F. S. L.; DA SILVA, A. A. **Manual de Teratogênese em Humanos**. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), 2011.

SCHWANZ, T. G.; LLORCA, M.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Perfluoroalkyl substances assessment in drinking waters from Brazil, France and Spain. **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 143-152, 2016.

SEN, C. K. K.; PATEL, S. L. C. M. Caudal regression syndrome. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 63, n. 2, p. 178-179, 2007.

SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; ROSA, J.; CAVACO, A.; CASTELA, G.; CASTELA, E.; OLEA, N.; BEBIANNO, M. J. Assessment of essential and nonessential metals and different metal exposure biomarkers in the human placenta in a population from the south of Portugal. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, p. 867-77, 2012.

SHANKAR, A.; XIAO, J.; DUCATMAN, A. Perfluorooctanoic Acid and Cardiovascular Disease in US Adults. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, n. 18, p. 1397-1403, 2012.

SOFTELAND, L.; KIRWAN, J. A.; HORI, T. S. F.; STORSETH, T. R.; SOMMER, U.; BERNTSSEN, M. H. G.; VIAN, M. R.; RISE, M. L.; WAAGBO, R.; TORSTENSEN, B. E.; BOOMAN, M.; OLSVIK, P. A. Toxicological effect of single contaminants and contaminant mixtures associated with plant ingredients in novel salmon feeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 157-174, 2014.

SLACK, J. M. W. Common features of development. In: SLACK, J. M. W. **Essential developmental biology**. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 6-20.

SLACK, J. M.; HOLLAND, P. W.; GRAHAM, C. F. The zootype and the phylotypic stage. **Nature**, v. 361, p. 490-492, 1993.

SORENSEN, J. P. R.; LAPWORTH, D. J.; NKHUWA, D. C. W.; STUART, M. E.; GOODDY, D. C.; BELL, R. A.; CHIRWA, M.; KABIKA, J.; LIEMISA, M.; CHIBESA, M.; PEDLEY, S. Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. **Water research**, v. 72, p. 51-63, 2015.

STEENLAND, K.; FLETCHER, T.; SAVITZ, D. A. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1100-1108, 2010.

STEIN, C. R.; SAVITZ, D. A.; ELSTON, B.; THORPE, P. G.; GILBOAC, S. M. Perfluorooctanoate exposure and major birth defects. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 15-20, 2014.

SUN, H.; CHEN, W.; WANG, D.; JIN, Y.; CHEN, X.; XU, Y. The effects of prenatal exposure to lowlevel cadmium, lead and selenium on birth outcomes. **Chemosphere**, v. 108, p. 33-39, 2014.

SUWAZONO, Y.; KIDO, T.; NAKAGAWA, H.; NISHIJO, M.; HONDA, R.; KOBAYASHI, E.; DOCHI, M.; NOGAWA, K. Biological half-life of cadmium in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure. **Biomarkers**, v. 14, n. 2, p. 77-81, 2009.

TARAZONA, J. V.; RAMOS-PERALONSO, M. J. Ecotoxicology. In: WEXLER, P.; ABDOLLAHI, M.; PEYSTER, A.; GAD, S. C.; GREIM, H.; HARPER, S.; MOSER, V. C.; RAY, S.; TARAZONA, J.; WIEGAND, T. J. **Encyclopedia of Toxicology**. Elsevier, 2014. p. 276-280.

TEJERIZO-GARCÍA, A.; MARINO, M.; BELLOSOA, M.; VILLALBA, A.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, S. P.; RUIZ, M. A.; HENRÍQUEZ, A.; ALCÁNTARA, R.; LANCHARES, J.

L.; TEJERIZO-LÓPEZ, L. C. Iniencefalia. **Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia**, v. 33, n. 4, p. 130-139, 2006.

TÊTE, N.; DURFORT, M.; RIEFFEL, D.; SCHEIFLER, R.; SÁNCHEZ-CHARDI, A. Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter. **Science of the Total Environment**, v. 481, p. 167-177, 2014.

THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Effects of Cadmium on Formation of the Ventral Body Wall in Chick Embryos and Their Prevention by Zinc Pretreatment. **Teratology**, v. 64, p. 87-97, 2001.

THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, p. 1703-1709, 2007.

THOMPSON, J.; DOI, T.; POWER, E.; BALASUBRAMAN, I.; PURI, P.; BANNIGAN, J. Evidence against a direct role for oxidative stress in cadmium-induced axial malformation in the chick embryo. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 3, p. 390-398, 2010.

THOMPSON, J.; HIPWELL, E.; LOO, H. V.; BANNIGAN, J. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 539-548, 2005.

THOMPSON, J.; WONG, L.; LAU, P. S.; BANNIGAN, J. Adherens junction breakdown in the periderm following cadmium administration in the chick embryo: distribution of cadherins and associated molecules. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 39-46, 2008.

TRIER, X.; GRANBY, K.; CHRISTENSEN, J. H. Polyfluorinated surfactants (PFS) in paper and board coatings for food packaging. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 1108-20, 2011.

ULHAQ, M.; SUNDSTROM, M.; LARSSON, P.; GABRIELSOON, J.; BERGMAN, A.; NORRGREN, L. ORN, S. Tissue uptake, distribution and elimination of ¹⁴C-PFOA in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 163, p. 148-157, 2015.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN STEENIS, G.; VAN LOGTEN, M. Neurotoxic effect of the dithiocarbamate tecoram on the chick embryo. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 686, p. 675-686, 1971.

VIZCAINO, E.; GRIMALT, J. O.; SOMOANO-FERNÁNDEZ, A.; TARDON, A. Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. **Environmental International**, v. 65, p. 107-115, 2014.

WALKER, J. B.; HOUSEMAN, J.; SEDDON, L.; MCMULLEN, E.; TOFFLEMIRE, K.; MILKS, C.; CORRIVEAU, A.; WEBBER, J-P.; LEBLANC, A.; WLAKER, M.; DONALDSON, S.; OOSTDAM, J. V. Maternal and umbilical cord blood levels of mercury,

lead, cadmium and essential trace elements in Arctic Canada. **Environmental Research**, v. 100, p. 295-318, 2006.

WANG, M. Y.; CHEN, J. F.; LIN, K. F.; CHEN, Y. H.; HU, W.; TANGUAY, R. L.; HUANG, C. J.; DONG, Q. X. Chronic zebrafish PFOS exposure alters sex ratio and maternal related effects in F1 offspring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 2073–2080, 2011.

WANG, B.; CHEN, Q.; SHEN, L.; ZHAO, S. PANG, W.; ZHANG, J. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in cord blood of newborns in Shanghai, China: Implications for risk assessment. **Environment International**, v. 97, p. 7-14, 2016.

WANG, Y-M.; WANG, H. J.; PENG, S-Q. Lipid peroxidation and antioxidant defense impairment in the hearts of chick embryos induced by *in ovo* exposure to *Fusarium* mycotoxin butenolide. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 7, p. 781–786, 2008.

WELLS, P. G; LEE, C. J.; MCCALLUM, G. P.; PERSTIN, J.; HARPER, P. A. Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 196, p.131–162, 2010.

WHO. Exposure do cadmium: a major public health concern. **World Health Organization**, 2010.

WHITE, S. S.; FENTON, S. E.; HINES, E. P. Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, p. 16-26, 2011.

WILSON, J.; BERNTSEN, H. F.; ZIMMER, K. E.; FRIZZELL, C.; VERHAERGEN, S.; ROPSTAD, E.; CONNOLLY, L. Effects of defined mixtures of persistent organic pollutants (POPs) on multiple cellular responses in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, using high content analysis screening. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 294, p. 21-31, 2016.

WOLF, C. J.; FENTON, S. E. ; SCHMID, J. E.; CALAFAT, A. M.; KUKLENYIK, Z.; BRYANT, X. A.; THIBODEAUX, J.; DAS, K. P.; WHITE, S. S.; LAU, C. S.; ABBOTT, B. D. Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures. **Toxicological Sciences**, v. 95, p. 462-473, 2007.

WOLPERT, L.; BEDDING, R; BROCKES, J.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. 3 ed. Artmed, 2008.

WU, K.; XU, X.; PENG, L.; LIU, J.; GUO, Y.; HUO, X. Association between maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) from electronic waste recycling and neonatal health outcomes. **Environment International**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2012.

XU, Y.; NOONAN, G.; BEGLEY, T. Migration of perfluoroalkyl acids from food packaging to food simulants. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 30, p. 899–908, 2013.

YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

YEUNG, L. W. Y.; GURUGE, K. S.; YAMANAKA, N.; MIYAZAKI, S.; LAM, P. K. S. Differential expression of chicken hepatic genes responsive to PFOA and PFOS. **Toxicology**, v. 237, p. 111-125, 2007.

YI, X.; BAO, V. W. W.; LEUNG, K. M. Y. Binary mixture toxicities of triphenyltin with tributyltin or copper to five marine organisms: Implications on environmental risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, 2017. No prelo.

ZELLER, I.; KNOFLACH, M.; SEUBERT, A.; KREUTMAYER, S. B.; STELZMÜLLER, M. E.; WALLNOEFER, E.; BLUNDER, S.; FROTSCHNIG, S.; MESSNER, B.; WILLEIT, J.; DEBBAGE, P.; WICK, G.; KIECHL, S.; LAUFER, G.; BERNHARD, D. Lead Contributes to Arterial Intimal Hyperplasia Through Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor–Mediated Endothelial Interleukin 8 Synthesis and Subsequent Invasion of Smooth Muscle Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, p. 1733-1740, 2010.

ZHANG, G-B.; WANG, H.; HU, J.; GUO, M-Y.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; YU, Z.; FU, L.; CHEN, Y-H.; XU, D-X. Cadmium-induced neural tube defects and fetal growth restriction: Association with disturbance of placental folate transport. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 306, p. 79-85, 2016.

ZHANG, J.; FU, Y.; LI, J.; WANG, J.; HE, B.; XU, S. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 345-349, 2009.

ZHAO, Z.; XIE, Z.; MÖLLER, A.; STURM, R.; TANG, J.; ZHANG, G.; EDINGHAUS, R. Distribution and long-range transport of polyfluoroalkyl substances in the Arctic, Atlantic Ocean and Antarctic coast. **Environmental Pollution**, v. 170, p. 71-77, 2012.

ZHU, B.; LIU, L.; LI, D-L.; LING, F.; WANG, G-X. Developmental toxicity in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos exposed to Cu, Zn and Cd. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 269-277, 2014.

ZIMMERMANN, C. Microscopia vegetal. **Brotéria**, v. II, p. 5-40, 1903.